

Rolle peripherer Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. med. Yvonne Dörffel

geboren am 15.06.1962 in Hennigsdorf

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Eingereicht am: 12.06.2001

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 26.03.2002

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Philipp

2. Prof. Dr. med. Günter Linß

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	2
2. Zusammenfassung	6
3. Thesen	9
4. Einleitung	12
4.1. Die essentielle Hypertonie	12
4.2. Immunsystem und Hypertonie	14
4.2.1. Die Immunpathologie der klinischen essentiellen Hypertonie	15
4.2.1.1. Die Antikörperantwort beim essentiellen Hypertoniker	15
4.2.1.2. Die zellvermittelte Immunantwort beim essentiellen Hypertoniker	16
4.2.1.3. Das Komplementsystem beim essentiellen Hypertoniker	17
4.2.2. Immunpathologie der experimentellen spontanen Hypertonie	17
4.3. Die Rolle des Renin-Angiotensin Systems in der Immunpathologie	18
4.4. Hypertonie und vermehrte Superoxidproduktion	21
4.5. Periphere Monozyten	22
4.5.1. Aktivierung peripherer Monozyten	24
4.5.1.1. Pro-entzündliche Zytokine	25
4.5.1.2. Oberflächenmarker	27
4.6. Endothelzell-Monozyteninteraktionen	28
4.7. Hypertonie und Arteriosklerose	29
5. Problemstellung	35
6. Material und Methoden	37
6.1. Chemikalien und Reagenzien	37
6.2. Periphere Monozyten	38
6.2.1. Isolierung der Monozyten aus dem peripheren Blut	38

6.2.2. Identifikation der Monozyten aus dem peripheren Blut mittels fluoreszenzaktiviertem Flusszytometer	40
6.2.3. Stimulation peripherer Monozyten und Zellkultur	41
6.3.Zytokinassays	42
6.4.Zytokin mRNA Bestimmungen	42
6.4.1. Extraktion der RNA	42
6.4.2. Reverse Transkription (RT)	43
6.4.3. Semiquantitative Polymerasekettenreaktion	45
6.5.Chemilumineszenz-Assay und Stimulation der Zellen	46
6.6.Adhäsionsmoleküle	47
6.6.1. Bestimmung der Adhäsionsmoleküle mittels ELISA	47
6.6.2. Identifikation aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle der Monozyten mittels FACS	47
6.7.Humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)	48
6.7.1. Isolierung der HUVEC	48
6.7.2. Kultivierung der HUVEC	49
6.7.3. Identifikation der HUVEC	49
6.8.Monozyten-Adhäsionsassays	50
6.9.Untersuchungen am Menschen	51
6.10. Expression von Daten	61
7.Ergebnisse	62
7.1.Immunologische Aktivierung von isolierten peripheren Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie	62
7.1.1. Sekretion pro-entzündlicher Zytokine	62
7.1.1.1. Interleukin-1 β	62
7.1.1.2. Tumor Nekrose Faktor- α	67

7.1.1.3.	Interleukin-6	69
7.1.2.	Bestimmung der mRNA pro-entzündlicher Zytokine	70
7.1.2.1.	IL-1 β mRNA Konzentration	71
7.1.2.2.	TNF- α mRNA Konzentration	72
7.1.3.	Superoxidproduktion	74
7.1.4.	Adhäsionsmoleküle	76
7.1.4.1.	Serumkonzentration zirkulierender Adhäsionsmoleküle	76
7.1.4.2.	Aktivierungsabhängige Oberflächenmoleküle auf den Monozyten	76
7.2.	Adhäsionsassays	80
7.2.1.	Unstimulierte Adhäsion	80
7.2.2.	Adhäsion nach Stimulation	80
7.2.2.1.	LPS	80
7.2.2.2.	Angiotensin II	81
7.2.2.3.	Eprosartan	82
7.3.	Korrelationen	83
7.3.1.	Zytokinkonzentration und Blutdruck	84
7.3.2.	Zytokinkonzentration und Alter	85
7.3.3.	Adhäsion und Blutdruck	86
7.3.4.	Adhäsion und Alter	87
8.	Diskussion	89
8.1.	Aktivierung peripherer Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie	89
8.1.1.	Sekretion pro-entzündlicher Zytokine	90
8.1.2.	Superoxidproduktion	95
8.1.3.	Aktivierungsabhängige Oberflächenmarker	97
8.2.	Adhäsion	100
8.2.1.	Adhäsionsmoleküle im Serum	101

8.2.2. Adhäsion peripherer Monozyten an HUVEC	103
8.3. Korrelationen der Monozytenadhäsion und Zytokinsekretion mit Alter und Blutdruck der Probanden.....	105
8.4. Methodenkritik	107
8.5. Fazit.....	109
9. Abkürzungen	111
10. Literaturverzeichnis	114
11. Danksagung	143
12. Eidesstattliche Versicherung	144

2. Zusammenfassung

Die initiierenden wie auch perpetuierenden Mechanismen, der essentiellen Hypertonie und in deren Folge die vorzeitige Arteriosklerose, sind im Detail nicht erschöpfend geklärt.

Ein erstes Ziel der Arbeit war es Methoden aufzubauen, die die funktionellen Eigenschaften von peripheren Monozyten ermitteln sollten, um die Rolle dieser Zellen bei der essentiellen Hypertonie zu erfassen. Es wurde versucht, die immunologischen Mechanismen der Entzündung oder Voraktivierung dieser Zellen zu charakterisieren. Dabei waren eine Reihe methodischer Schwierigkeiten zu bewältigen, die sich aus der Tatsache ergaben, dass die Isolierung zirkulierender Monozyten äußerst kompliziert und anfällig ist.

Es wurde der Aktivierungsgrad der peripheren Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu Normalkontrollen anhand ihrer Zytokinsekretion untersucht. Mononukleäre Phagozyten stellen bekanntermaßen bei Entzündungen erhöhte Mengen spezifischer Mediatoren (pro-entzündliche Zytokine) wie auch unspezifische Effektormoleküle bereit. Die untersuchten Substanzen waren die pro-entzündlichen Zytokine Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α). Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die peripheren Monozyten von essentiellen Hypertonikern im Vergleich zu Alter- und Geschlecht gematchten, normotensiven Gesunden vermehrt IL-1 β und TNF- α nach Stimulation mit Lipopolysaccharide (LPS) sezernieren. Auch eine signifikant höhere Sekretion von IL-1 β nach Stimulation mit Angiotensin II in physiologisch relevanter Konzentration wurde nachgewiesen. Wurden die Monozyten mit einem AT1-Rezeptorantagonisten vorinkubiert, war nach Angiotensin II Stimulation kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen mehr nachweisbar.

Um nachzuweisen, ob die vermehrte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine peripherer Monozyten von Hypertonikern durch eine transkriptionelle Hochregulation verursacht wird, wurde eine semiquantitative RT-PCR (Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) durchgeführt. Dabei konnte nach LPS Stimulation eine signifikante Erhöhung der Sekretion von pro-entzündlichen Zytokinen der Hypertoniker im Vergleich zu den Probanden bei den IL-1 β und TNF- α Amplifikatonsprodukten der

totalen RNA gemessen werden. Nach Stimulation mit Angiotensin II wurde der Unterschied nur für die IL-1 β Amplifikationsprodukte der RNA gesehen.

Neben spezifischen Mediatoren sezernieren aktivierte Monozyten eine Reihe unspezifischer toxischer Effektormoleküle wie z.B. Sauerstoffsuperoxid. So wurde die Chemilumineszenzaktivität (CL) mittels Lucigenin als Maß der Superoxidproduktion peripherer Monozyten bestimmt. Die Gipfel der CL Aktivität der Monozyten von Hypertonikern waren nach PMA (Phorbol-Myristyl-Acetat) bzw. Angiotensin II signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen.

In Folgeuntersuchungen wurde der Aktivierungsgrad peripherer Monozyten von Hypertoniepatienten anhand ihrer Expression von Aktivierungsmarkern auf der Monozytenoberfläche mittels FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) untersucht. Dabei konnte eine vermehrte Expression von CD54, CD11a und CD11b auf der Monozytenoberfläche von Patienten im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird die Hypothese generiert, dass den voraktivierten Monozyten von Hypertoniepatienten eine entscheidende Rolle bei der Initiierung von Gefäßwandläsionen zu kommen könnte, welche die frühen arteriosklerotischen Veränderungen bei diesen Patienten im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung mitbegründen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher die Adhäsion peripherer Monozyten von Hypertonikern an humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) spontan bzw. nach Stimulation z.B. mit Angiotensin II im Vergleich zu Monozyten von normotensiven Gesunden überprüft. Umbilikalvenenendothelzellen wurden statt Patientenendothelzellen verwendet, da in vorhergehenden Untersuchungen erhöhte Spiegel der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei den Hypertonikern im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen wurden und jegliche Voraktivierung der Endothelzellen ausgeschlossen werden sollte. Die spontane Adhäsion der Monozyten von Hypertonikern sowie die Adhäsion nach Stimulation mit Angiotensin II an humane Endothelzellmonolayer war signifikant erhöht. Interessanterweise führte die Vorinkubation mit einem AT1-Rezeptorantagonisten bei den Patientenmonozyten zu einer Reduzierung der Endothelzelladhäsion, so dass kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen mehr nachweisbar war. Vorausgesetzt, dass diese in vitro Befunde in vivo übertragbar sein sollten, würde dem Angiotensin II in der Genese früher

arteriosklerotischer Prozesse bei Hypertonikern eine entscheidende pathophysiologische Bedeutung zukommen und AT1-Rezeptorantagonisten wären in verschiedener Hinsicht therapeutisch interessante Substanzen.

3. Thesen

Die Regulation der Aktivierung peripherer Monozyten hängt von komplexen Gleichgewichten verschiedener Mediatoren ab. Dabei sind Zytokine hochspezifische Botenstoffe in der Kommunikation zwischen Immunzellen. Auch Angiotensin II und Adhäsionsmoleküle können einen erheblichen regulativen Einfluss haben. Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Aktivierung peripherer Monozyten bei Patienten mit unbehandelter essentieller Hypertonie. So scheinen die zirkulierenden Monozyten, eine wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen der Gefäßwände und damit vorzeitigen Arteriosklerose der Hypertoniker zu spielen.

1. Bei der essentiellen Hypertonie erfolgt nach Stimulation durch Angiotensin II oder LPS eine vermehrte Bereitstellung pro-entzündlicher Zytokine durch periphere Monozyten.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Nach 24-stündiger Kultur von peripheren Monozyten, welche mittels Dichtegradientenzentrifugation und Plastikadhärenz bzw. Dynabeads isoliert wurden, findet sich nach Stimulation eine gegenüber den Normalkontrollen erhöhte Freisetzung pro-entzündlicher Zytokine (TNF- α , IL-1 β) im ELISA. Eine erhöhte Sekretion ließ sich nicht für IL-6 nachweisen.

2. AT1-Rezeptorantagonisten deaktivieren in vitro periphere Monozyten von Hypertoniepatienten auf ein mit Normalkontrollen vergleichbares Maß.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Wurden die peripheren Monozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie 30 min mit einem AT1-Rezeptorantagonisten vorinkubiert, war nach Angiotensin II Stimulation kein signifikanter Unterschied der IL-1 β Freisetzung zwischen Patienten- und Kontrollmonozyten mehr vorhanden. In geringem Umfang reduzierte sich die IL-1 β Freisetzung der Monozyten gesunder Probanden.

3. Die LPS Stimulation der peripheren Monozyten essentieller Hypertoniker führt zur transkriptionellen Hochregulation der Amplifikationsprodukte für Interleukin-1 β und Tumor Nekrose Faktor- α .

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Die vermehrte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine durch periphere Monozyten von Hypertonikern wird durch eine transkriptionelle Hochregulation verursacht. Mittels semiquantitativer reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion konnte eine signifikante Erhöhung der IL-1 β und TNF- α Amplifikationsprodukte der RNA nach LPS Stimulation im Vergleich zu den Probanden gemessen werden.

4. Die Angiotensin II Stimulation der peripheren Monozyten essentieller Hypertoniepatienten führt zur Erhöhung der Amplifikationsprodukte für Interleukin-1 β im Vergleich zu den Normalkontrollen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Die Stimulation der Monozyten mit Angiotensin II führt zu einer signifikanten Heraufregulation der IL-1 β Amplifikationsprodukte der RNA der Patientenmonozyten gegenüber den Normalkontrollen nachgewiesen mittels reverser Transkriptase Polymerasekettenreaktion.

5. Die Chemilumineszenzaktivität zirkulierender Monozyten von Hypertonikern ist nach Stimulation mit Angiotensin II bzw. PMA vermehrt.

Neben spezifischen pro-entzündlichen Mediatoren sezernieren aktivierte Monozyten eine Reihe unspezifischer toxischer Effektormoleküle wie z.B. Sauerstoffsuperoxid. Die Chemilumineszenzaktivität ist ein Maß der Superoxidproduktion peripherer Monozyten.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Nach Messung der Chemilumineszenzaktivität mittels Biolumat über 2 Stunden liegen die Gipfel der Aktivität peripherer Monozyten von Hypertonikern nach PMA bzw. Angiotensin II Stimulation signifikant höher im Vergleich zu den Kontrollen.

6. Die Serumspiegel der löslichen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 sind bei Hypertonikern erhöht.

Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 werden vor allem von Endothelzellen sezerniert, in geringerem Umfang auch von Monozyten. Das Adhäsionsmolekül E-Selektin wird ausschließlich von Endothelzellen produziert.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Die Serumspiegel der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 bei Hochdruckpatienten, bestimmt mittels ELISA, sind im Vergleich zu

Normalkontrollen signifikant erhöht. Die Serumspiegel von E-Selektin weisen keinen signifikanten Unterschied auf.

7. Auf der Monozytenoberfläche von Hypertoniepatienten werden vermehrt Aktivierungsmarker exprimiert.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Mit der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie von peripheren Monozyten erfolgte eine Identifikation aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle. Dabei konnte eine vermehrte Expression von CD54, CD11a, CD11b auf der Monozytenoberfläche von Patienten im Vergleich zu Kontrollen nachgewiesen werden. Die Aktivierungsmarker CD29, CD44 und CD31 wurden nicht vermehrt exprimiert.

8. Die Spontanadhäsion von Patientenmonozyten an humane Umbilikalvenen-endothelzellen ist im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht.

Die Adhärenz von Monozyten an Endothelzellen gilt als einer der initiiierenden Schritte bei Ausbildung von Gefäßwandläsionen.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Mit ^{51}Cr markierte Monozyten von Hochdruckpatienten weisen im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant höhere Adhäsion an humane Umbilikalvenen-Endothelzellmonolayer auf.

9. Die Adhäsion peripherer Monozyten von Hypertonikern an Endothelzellmonolayer nach Stimulation mit Angiotensin II ist vergleichsweise vermehrt.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Die Stimulation der Monozyten in vitro mit Angiotensin II führt zu einer vermehrten Adhärenz an humane Umbilikalvenenendothelzellen bei Patienten und Kontrollen, wobei die der Patientenmonozyten im Adhäsionsassay signifikant erhöht ist im Vergleich zu den Monozyten der Kontrollen.

10. Die Vorinkubation mit einem AT1-Rezeptorantagonisten führt zur Reduzierung der Endothelzelladhäsion peripherer Patientenmonozyten.

Die vorgelegte Arbeit zeigt: Die Vorinkubation der Monozyten für 30 min mit einem AT1-Rezeptorantagonisten reduziert die Endothelzelladhäsion in dem Maße, dass nach anschließender Stimulation mit Angiotensin II kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen mehr nachweisbar ist.

4. Einleitung

4.1. Die essentielle Hypertonie

Nach der WHO ist die oberste Grenze des normalen Blutdrucks mit systolisch 140 mmHg und diastolisch 90 mmHg definiert (JNC-VI, 1997) (Tabelle 1).

Tabelle 1: Klassifikation des Blutdrucks für Erwachsene nach JNC-VI (Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure (JNC-VI), 1997)

Kategorie	Systolischer Blutdruck (mmHg)	Diastolischer Blutdruck (mmHg)
Optimal	< 120	< 80
Normal	< 130	85
Hochnormal	130 - 139	85 - 89
Milde Hypertonie (Stadium I)	140 - 149	90 - 99
Mäßige Hypertonie (Stadium II)	160 - 179	100 - 109
Schwere Hypertonie (Stadium III)	≥ 180	≥ 110

„Voraussetzung für die Diagnosestellung sind mehrfach, zu unterschiedlichen Tageszeiten und an verschiedenen Tagen gemessene Blutdruckwerte über 140/90 mmHg. Normalerweise ist die Variabilität dieses Kreislaufparameters außerordentlich hoch. Neben der tageszeitlichen Biorhythmik spielen hormonelle, psychische und physische

Einflussfaktoren wie auch Genussmittel eine bedeutende Rolle, so dass die WHO für die Diagnosestellung mindestens drei Messungen unter standardisierten Bedingungen, bei wenigstens zwei verschiedenen Gelegenheiten, als *conditio sine qua non* fordert.

Liegen die Gelegenheitsblutdruckwerte 3 Monate nach Erstdiagnostik und Durchführung nichtmedikamentöser Maßnahmen noch im Bereich der milden Hypertonie, so ist vor einer medikamentösen Hochdrucktherapie, deren Indikation vom individuellen Risikoprofil des Patienten abhängt, zumindest die Verifizierung derselbigen durch die Selbstmessung unter häuslichen Bedingungen oder besser eine ambulante monitorisierte Blutdruckmessung über 24 h (ABDM) zu fordern.“ (Scholze J., 1999)

Das JNC-VI empfiehlt als Basisdiagnostik eine sorgfältige Anamnese und klinische Untersuchung, zudem ein EKG, einen Urinstatus (Eiweiß, Glukose, Leukozyten, Bakterien) und folgende Blutuntersuchungen: kleines Blutbild, Kreatinin, Kalium, Glukose, Cholesterol, Triglyceride, Harnsäure (JNC-VI, 1997). Weitere Diagnostik wird als notwendig erachtet bei:

- Patienten mit einem Hochdruck, welche jünger als 15 Jahre sind.
- Ältere Patienten (> 65 Jahre) mit einer kurzfristig aufgetretenen mäßigen oder schweren Hypertonie.
- Patienten mit persistierendem Bluthochdruck trotz Dreierkombination, welche ein Diuretikum einschließt.
- Patienten mit Hypertonie und Kopfschmerzen bzw. unerklärlichen Schweißausbrüchen und Palpitationen.

Die erweiterte Diagnostik umfasst u.a. Laborparameter wie Kalzium, Natrium, Harnstoff, HDL, LDL, Fibrinogen, TSH, oGTT, Röntgen-Thorax, Echokardiographie, Belastungs-EKG, Ultraschall-Abdomen einschließlich der Nieren und Aorta abdominalis, Sonographie und Doppler der extrakraniellen -, Extremitätenarterien und Aa. renales.

Nach epidemiologischen Untersuchungen aus den USA und Europa sind etwa 15 % bis 30 % der erwachsenen Bevölkerung nach den oben angegebenen WHO-Kriterien als Hypertoniker zu bezeichnen. Gut 95 % aller Hypertonien sind primäre oder essentielle Hypertonien, womit lediglich gesagt ist, dass keine organische Ursache nachweisbar ist.

Die Statistiken großer Lebensversicherungsgesellschaften aus den USA zeigen, dass schon bei einem „normalen“ Blutdruck von 130/90 mmHg die Lebenserwartung je nach Alter und Geschlecht zwischen $\frac{1}{2}$ und 4 Jahren gegenüber vergleichbaren Personen mit Blutdruckwerten unter 130/90 mmHg reduziert ist. Bei einem Blutdruck von 150/100 mmHg und einem Alter von 45 Jahren ist mit einer Verkürzung der Lebenserwartung um 10 Jahre gegenüber Normotonikern mit Drücken unter 130/90 mmHg zu rechnen (Baird I.M., 1994; Carman W.J., 1994; Mörl H., 2000). Diese Daten relativieren die von der WHO festgesetzten Grenzwerte.

Man sollte sich deshalb bei therapeutischen Überlegungen betreffs der Trennlinie zwischen Normo- und Hypertonie an die Feststellung von Sir Georg Pickering halten: „Es gibt keine Grenzlinie. Die Beziehung zwischen arteriellem Druck und Todesfolge ist eine quantitative: je höher der Druck, desto schlechter die Prognose.“(Mörl H., 2000)

International orientiert man sich daher immer stärker am individuellen Risikoprofil des Patienten und teilt diese in Gruppen mit normalem, hohem und sehr hohem Risiko ein, wonach sich der Beginn einer Pharmakotherapie aber auch die Zielwerte orientieren (Scholze J, 1999).

4.2. Immunsystem und Hypertonie

Die Pathogenese der Hypertonie ist ein multifaktorieller Prozess, welcher die Interaktion von genetischen und Umweltfaktoren involviert. Die Pathophysiologie der Hypertonie

beinhaltet u.a. Veränderungen der Nierenfunktion, eine gesteigerte Aktivität des Renin-Angiotensin Systems und eine sympathische Hyperaktivität. In unterschiedlicher Ausprägung tragen Abnormalitäten der Volumenregulation, eine endotheliale Dysfunktion mit verstärkter Vasokonstriktion sowie Veränderungen der Arterienwand zur Ausbildung einer Hypertonie bei.

Zusätzlich nehmen seit den 70er Jahren die Hinweise auf immunologische Veränderungen bei zahlreichen Formen der experimentellen sowie klinischen Hypertonie zu. Es stellt sich die Frage, ob die immunologischen Alterationen als primär anzusehen sind oder lediglich sekundärerer Genese sind im Rahmen der vom Hochdruck induzierten Gewebeläsionen.

4.2.1. Die Immunpathologie der klinischen essentiellen Hypertonie

Bei Erkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematosus, der rheumatoiden Arthritis, der Hashimoto Thyreoiditis u.a. sind Dysfunktionen des Immunsystems bekannt. In der Ätiologie der humanen essentiellen Hypertonie werden dagegen Störungen des Immunsystems nur selten in Betracht gezogen, obwohl es dafür zahlreiche Anhaltspunkte gibt.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie wurden bereits veränderte Serum-Immunglobulinspiegel, Alterationen der humoralen und zellulären Immunfunktion sowie Abnormalitäten des Komplementsystems nachgewiesen.

4.2.1.1. Die Antikörperantwort beim essentiellen Hypertoniker

Kristensen et al. wiesen bei ca. 30 % der Patienten mit essentieller Hypertonie erhöhte Immunglobulinspiegel nach. Es ließ sich sogar eine positive Korrelation zwischen den Serum IgG Spiegeln und dem Blutdruck unbehandelter Patienten nachweisen (Kristensen

B.O., 1978a). Dabei ist bisher völlig unklar, warum die Immunglobulinspiegel bei Hypertonikern erhöht sind (Hilme E., 1989). Unklar ist weiterhin, ob es sich um einen primären pathologischen Prozess oder ein sekundäres Geschehen, verursacht durch Hypertonie initiierte Gefäßläsionen handelt.

Außerdem wurden bei Patienten mit essentieller Hypertonie signifikant erhöhte Spiegel von Autoantikörpern wie ANF (Antikörper gegen nukleäre Strukturen) und SMA (Antikörper gegen glatte Muskulatur) (Kristensen B.O., 1978b) sowie scheinbar spezifische Autoantikörper bei maligner Hypertonie (Gudbrandsson T., 1981; Hilme E., 1993) gefunden. Die Bedeutung der Autoantikörper in der Ätiologie der Erkrankung ist bisher völlig ungeklärt.

4.2.1.2. Die zellvermittelte Immunantwort beim essentiellen Hypertoniker

Es wird angenommen, dass zelluläre Immunmechanismen ebenfalls zur Pathogenese der essentiellen Hypertonie beitragen. So weisen Patienten mit milder essentieller Hypertonie eine verzögerte Überempfindlichkeit auf vaskuläre Antigene auf (Typ IV), welche durch sensibilisierte T-Lymphozyten vermittelt wird. Da Patienten mit einer diabetischen Angiopathie oder Arteriitis temporalis diese Immunantwort nicht aufweisen, scheint es sich nicht um ein sekundäres Phänomen nach Gefäßläsionen zu handeln (Olsen F., 1974). Bei maligner Hypertonie wurde über eine erhöhte Aktivität der T-Lymphozyten berichtet (Gudbrandsson T., 1981).

4.2.1.3. Das Komplementsystem beim essentiellen Hypertoniker

Eine andere wichtige Komponente des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem, welches aus mindestens 20 verschiedenen Plasmaproteinen besteht und dem Schutz vor Mikroorganismen dient. Das Protein C3 macht den größten Bestandteil des Komplementsystems aus. So ist die Aktivierung von C3 der entscheidende Schritt für die Aktivierung der Komplementkaskade. Für dieses Komplementprotein wurde ein genetischer Polymorphismus nachgewiesen: die Allele C3F und C3S, wobei das C3F Protein eher mononukleäre Zellen bindet. Interessanterweise exprimieren 64 % der Patienten mit essentieller Hypertonie das C3F Protein (Ebringer A., 1971).

4.2.2. Immunpathologie der experimentellen spontanen Hypertonie

Mehrere Modelle der spontanen Hypertonie (wie spontan hypertensive Ratten (SHR) oder Lyon hypertensive Ratten) weisen Abnormalitäten des Immunsystems auf, welche mit der Hochdruckerkrankung assoziiert sind.

Takeichi (Takeichi N., 1980) et al. berichteten über eine verminderte Anzahl von T-Lymphozyten bei erwachsenen SHR sowie eine signifikante Abnahme dieser Zellpopulation im Alter im Vergleich zu Wistar Kyoto Ratten (WKY). Außerdem wurde von Fanon nachgewiesen, dass die Funktion der T-Lymphozyten eingeschränkt ist (Fanon L.D., 1992). SHR weisen eine verminderte Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ IV auf. Ba zeigte, dass diese Veränderungen des Immunsystems bei SHR mit dem Hochdruck korrelierten (Ba D., 1982).

Weiterhin wurden Thymusantikörper sowie erhöhte IgA-Plasmaspiegel bei diesen Tieren nachgewiesen (Takeichi N., 1981; Chen C.-M., 1993). Die Interaktion von B- und T-Lymphozyten bei der Antikörperproduktion ist gestört.

Die Summe diese Abnormalitäten führte zu der Hypothese, dass die Hypertonie der SHR Ergebnis eines Autoimmunphänomens sein könnte (Bendlich A., 1981; Khraibi A.A., 1987; Bataillard A., 1989).

Das Immunsystem ist ebenfalls in die Ätiologie anderer Modelle der spontanen Hypertonie, wie das der Lyon hypertensiven Ratte involviert. So führt die neonatale Entfernung des Thymus bei diesen Tieren zur signifikanten Blutdrucksenkung (Bataillard A., 1986).

Bataillard konnte zeigen, dass die in vivo Gabe von Silica, einem selektiven Monozytotoxin, den Hypertoniegrad bei Lyon hypertensiven Ratten reduziert und die Ausbildung einer Hypertrophie des linken Ventrikels verhindert (Bataillard A., 1995).

Obwohl eine starke Assoziation zwischen Alterationen des Immunsystems und der Hypertonie vorhanden ist, sind die spezifischen immunologischen Mechanismen, welche zur Pathogenese des Bluthochdrucks beitragen, bisher unklar.

4.3. Die Rolle des Renin-Angiotensin Systems in der Immunpathologie

Eine wichtige pathophysiologische Komponente in der Hypertoniegenese ist das Renin-Angiotensin System (RAS). Angiotensin II ist das Endprodukt nach Spaltung seiner Vorstufen Angiotensinogen und Angiotensin I durch Renin und Angiotensin Converting Enzym. Systemisches Angiotensin II aktiviert die Arterien, Nieren, Nebennieren und das Herz, indem es u.a. die Noradrenalin-, Renin- und Aldosteronfreisetzung stimuliert. Vor Ort übt Angiotensin II autokrine-parakrine Effekte auf Arterien sowie das Herz aus und spielt eine wichtige Rolle in der Ausbildung der Atherosklerose. Angiotensin II ist ein starker Vasokonstriktor, bindet an Rezeptoren der glatten Muskulatur, welche zur

Aktivierung der Phospholipasen führen und aktiviert Calcium-Kanäle, was zu einer verstärkten Kontraktion der glatten Muskulatur führen kann (Chobanian A.V., 1996b).

Angiotensin II wirkt auf spezifische Rezeptoren: AT1 und AT2 ein, welche im gesamten Körper vorkommen. Die Wirkung erfolgt durch Induktion der Protoonkogene c-fos, c-myc und c-jun und der Genexpression von Wachstumsfaktoren wie TGF- β (transforming growth factor β), PDGF (platelet-derived growth factor) und Fibroblasten Wachstumsfaktor (Keidar S., 1998). Das führt u.a. zur Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur (Daemen M.J., 1991; Gibbons G.H., 1992). Es konnte auch gezeigt werden, dass Angiotensin II über den AT1- und AT2-Rezeptor zur Apoptose von Myozyten führt (Cigola E., 1997, de Gasparo M., 1999).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Angiotensin II zur Freisetzung von chemotaktischer Substanzen aus den Endothelzellen, welche zur Akkumulation von Neutrophilen führen, beiträgt (Farber H.W., 1985). Angiotensin II führt im Tierexperiment sowie beim Menschen zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in den zirkulierenden Monozyten und zellulären Elementen der Gefäßwand (Foris G., 1983; Holtz J., 1994). Diese Hochregulation erfolgt über Nuklearfaktor kappa-B (NF κ B) (Hernandez-Presa M., 1997). So wurde die beobachtete Aktivierung von Monozyten in Aorten von Ratten, welche mit Angiotensin II infundiert wurden, begleitet von einem signifikanten Anstieg der MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1) mRNA Expression (Capers Q., 1997).

Olsen berichtete, dass wiederholte Blutdruckanstiege, induziert durch intravenöse Injektionen von Angiotensin II, zu einer verzögerten Überempfindlichkeit (Typ IV) der Tiere auf Gefäßhomogenate führen (Olsen F., 1981) sowie eine autoimmun-ähnliche Erkrankung der eigenen Gefäße hervorrufen können (Olsen F., 1984). Fukai konnte

zeigen, dass Angiotensin II zu einer Zunahme des oxidativen Stresses führt, welcher zur Infiltration der Intima mit Monozyten/Makrophagen beitragen kann (Fukai T., 1999).

Durch diese komplexen Interaktionen sowie den hormonellen Einfluss, welcher zur Hypertonie führt, kann Angiotensin II die Ausbildung der Atherosklerose unterstützen (Paul M., 1992; Chobanian A.V., 1996b).

Autoradiographische Studien wiesen bereits 1991 Angiotensin II in frühen Atherom-ähnlichen Läsionen von Kaninchenarterien nach (Zambetis-Bellesis M., 1991). In einer Subpopulation von Rattenmakrophagen/-monozyten wurde die Expression von Renin nachgewiesen, somit können diese Zellen unter bestimmten pathologischen Bedingungen ein Reservoir für Renin im Gewebe darstellen (Iwai N., 1996).

Kitazono konnte 1995 große Mengen Angiotensin II in humanen mononukleären Zellen nachweisen (Kitazono T., 1995). Nach neuerer Literatur wird Angiotensin II in atherosklerotischen Plaques von Koronarien exprimiert (Schieffer B., Circulation 2000) und ist in den Makrophagen atherosklerotischer Läsionen beim Menschen enthalten (Potter D.D., 1998).

Bei Hypertonikern mit erhöhter Plasma-Renin Aktivität wurde ein fünffach höheres Risiko, einen Myokardinfarkt zu erleiden, nachgewiesen (Aldermann M.H., 1991).

Da die Oxidation von LDL einer der führenden Risikofaktoren zur Ausbildung einer Arteriosklerose sein soll, wurde die Beziehung zwischen Hochdruck und LDL Oxidation u.a. von Keidar untersucht (Keidar S., 1998). Dabei konnte er zeigen, dass Angiotensin II die Makrophagen-Lipidperoxidation der Maus in vivo und vitro verstärkt. Dieser Effekt war dosisabhängig und beinhaltete die Bindung von Angiotensin II an seine Oberflächenrezeptoren auf dem Makrophagen. Mit einem AT1-Rezeptorantagonisten konnten die atherosklerotischen Läsionen signifikant reduziert werden, so dass davon

auszugehen ist, dass Angiotensin II in die Atherogenese involviert ist. Ob Angiotensin II für die Initiierung dieser pathophysiologischen Veränderungen verantwortlich ist, bleibt unklar, allerdings scheint Angiotensin II Co-Faktor oder Marker dieser Alterationen zu sein.

Das Renin-Angiotensin System kann auf mehreren Ebenen gehemmt werden und damit die Wirkung seines aktiven Peptids Angiotensin II reduziert werden. Die Blockade des AT1-Rezeptors durch einen AT1-Antagonisten ist dabei spezifisch. Allerdings wird Angiotensin II nicht ausschließlich über das RAS generiert. Nahezu alle physiologischen und pathophysiologischen Effekte von Angiotensin II werden über den AT1-Rezeptor vermittelt. Nach neuesten Erkenntnissen weist der AT2-Rezeptor im Gegensatz zum AT1-Rezeptor antiproliferative Eigenschaften auf und beeinflusst die Differenzierung und Regeneration der Nervenzellen (de Gasparo M, 1999).

4.4. Hypertonie und vermehrte Superoxidproduktion

Superoxidanionen reduzieren die Bildung von NO durch das Endothel (Vanhoutte P.M., 1995), verstärken die Leukozytenadhäsion und führen zur Zunahme des peripheren Widerstandes (Swei A., 1997).

Erste Hinweise auf eine vermehrte Superoxidproduktion bei der Hypertonie erbrachten Messungen der Reduktion von Nitroblautetrazolin in Tieren, welche mittels Infusion von Vasokonstriktoren kurzfristig hohe Blutdruckwerte aufwiesen (Wei E.P., 1985; Kontos H.A., 1985). Interessanterweise war gleichzeitig die Endothel-abhängige Gefäßdilatation deutlich abgeschwächt. Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass Superoxid eine Schlüsselrolle bei den Hypertonie-induzierten Veränderungen der vaskulären Reaktivität einnimmt.

In weiteren Studien wurde die Superoxidproduktion in Endothelzellen SHR sowie Aortensegmenten von Ratten nach Infusion von Angiotensin II direkt gemessen (Grunfeld S., 1995; Rajagopalan S., 1996). Laut Grunfeld führte die Zugabe von Superoxid-dismutase nicht nur zur Normalisierung der Superoxidproduktion sondern auch zur Normalisierung des Blutdruckes.

Eine erhöhte Superoxidproduktion wurde ebenfalls bei Patienten mit essentieller Hypertonie nachgewiesen (Sagar S., 1992).

In die Mechanismen der Monozytenrekrutierung sind redox-sensitive Schritte involviert, welche im Tierversuch auch ohne Hyperlipidämie mit einer vermehrten Anlagerung mononukleärer Zellen an die Arterienwand assoziiert sind (Haudenschild C.C., 1981). Allerdings weisen 40% der Hypertoniker Gesamtplasmacholesterolspiegel von ≥ 240 mg/dL (Working Group on Management of Patients with Hypertension and High Blood Cholesterol, 1991). So scheint ein Grund für das gehäufte Auftreten von Arteriosklerose bei Hypertonikern der oxidative Stress bzw. die Schädigung des Endothels zu sein.

Letztendlich gibt es inzwischen Beweise dafür, dass die NO Produktion bei der Hypertonie nicht alteriert ist, aber die Bioverfügbarkeit aufgrund der exzessiven Superoxidproduktion der Gefäßwand reduziert ist (Kojda G., 1999).

4.5. Periphere Monozyten

Die Monozyten gehören zu den mononukleären Phagozyten, welche sich von einer gemeinsamen Stammzelle aus dem Knochenmark ableiten. Die Vorläufer der Myeloidzellen werden zu Promonozyten im Knochenmark, die zu Blutmonozyten ausdifferenzieren. Sie wandern aus einem zirkulierenden Pool in die verschiedenen

Organe und Gewebesysteme aus und werden zu Makrophagen. Im Vergleich zum Lymphozyten ist der humane periphere Monozyt eine große Zelle von 10-16 µm Durchmesser, die gewöhnlich einen hufeisenförmigen Nukleus hat und oft schwach azidophile Granula enthält (Abb. 1).

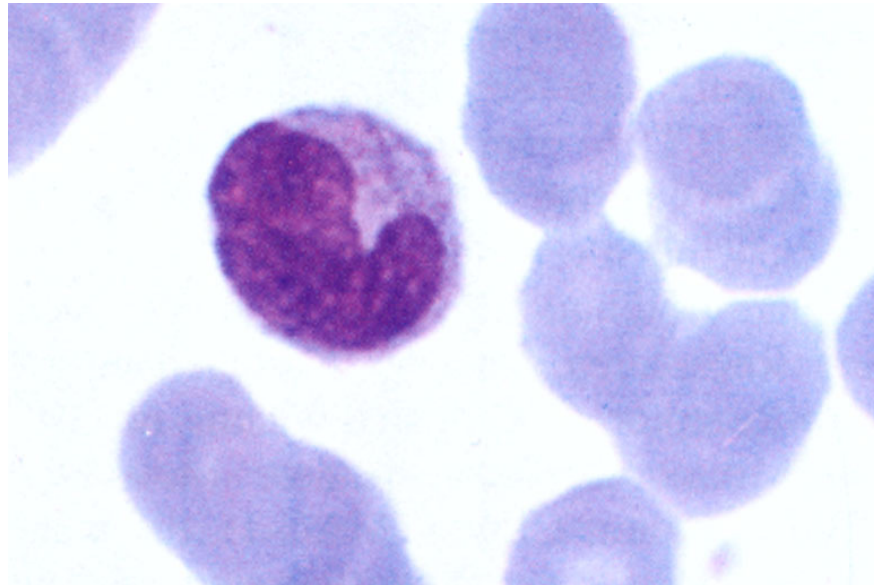


Abb. 1 Peripherer Monozyt mit charakteristischem hufeisenförmigen Kern und azidophiler Granula, Giemsa-Färbung.

Monozyten zeigen eine starke Adhäsion an Glas- und Plastikoberflächen und können Organismen oder sogar Tumorzellen in vitro aktiv phagozytieren. Für Monozyten spezifisch ist der CD14-Rezeptor für lipopolysaccharidbindendes Protein, das normalerweise im Serum vorhanden ist und gramnegative Bakterien umhüllt (Roitt I., 1998).

4.5.1. Aktivierung peripherer Monozyten

Die mögliche Rolle zirkulierender Monozyten in der Pathologie der Hypertonie und Arteriosklerose des Hypertonikers ist von großem Interesse, aber aufgrund der komplizierten und anfälligen Isolierung dieser Zellen sind diesbezügliche Publikationen spärlich. So ist die Anzahl aktivierter Monozyten bei SHR signifikant erhöht gegenüber den Werten von normotensiven Wistar Kyoto Ratten (Schmid-Schönbein G.W., 1991).

Die ubiquitär vorkommenden Monozyten, Vorstufe der Gewebsmakrophagen, sind an jeder Phase der Atherogenese beteiligt (Ross R., 1999). Die aus den Monozyten gebildeten Makrophagen sind Antigen-präsentierende Zellen, sezernieren Zytokine, Chemokine, Wachstum-regulierende Moleküle, Metallproteinasen, andere hydrolytische Enzyme und phagozytieren.

Allgemein wird davon ausgegangen, dass primär die Sekretion von Endothelzellfaktoren zur Monozytenaktivierung führt (Lüscher T.F., 1995).

Die Aktivierung von mononukleären Phagozyten wird in der Regel als zweiphasiges Ereignis aufgefasst.

Durch den initialen Kontakt mit sensibilisierenden Stimuli werden eine Reihe von Zellfunktionen heraufreguliert (Johnston R.B., 1988). Dies beinhaltet eine erhöhte basale, intrazelluläre Kalziumkonzentration wie auch eine vermehrte Fähigkeit zur Endozytose (Marodi L., 1991 und 1993).

Durch den zweiten Kontakt mit z.B. Adhäsionsmolekülen, bakteriellen chemotaktischen Produkten wie FMLP (Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin), Lipopolysaccharide werden die mononukleären Zellen aktiviert und sezernieren große Mengen pro-entzündlicher Mediatoren (Johnston R.B., 1988; Zembala M., 1989; Gallin J.I., 1992).

Solche Mediatoren sind entweder spezifischer Natur (Zytokine, Leukotriene, Prostaglandine etc.) oder es sind unspezifische Effektormoleküle (Superoxidradikale, Stickoxid) deren Aufgabe die ungezielte Zerstörung von Antigenen und umliegendem Gewebe ist.

4.5.1.1. Pro-entzündliche Zytokine

Als Initiatoren von Entzündungsreaktionen werden Antigen-präsentierende Zellen und insbesondere die, durch sie sezernierten, pro-entzündlichen Zytokine angesehen. Aufgrund ihrer potenten, entweder direkt immunologisch aktivierenden Eigenschaften oder über weitere Botenstoffe wie Zytokine oder Lipidmediatoren vermittelten Wirkung werden Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumor Nekrose Faktor- α häufig auch zusammenfassend als pro-entzündliche Zytokine bezeichnet (Gallin J.I., 1992). Eine erhöhte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine gilt als Hinweis für eine Aktivierung zirkulierender Monozyten (Jelinek D.F., 1987; Fiotti N., 1999). Aktivierte Monozyten bilden auch Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF.

Eine immunologische Aktivierung mit erhöhter Zytokinfreisetzung ist an den peripheren Monozyten von Patienten unterschiedlichster Krankheitsbilder zu finden: wie M.Crohn, Colitis ulzerosa, Autoimmunerkrankungen, rheumatoider Arthritis oder Kollagenosen (Kirkham B., 1991; Schreiber S., 1992; Cominelli F., 1996; Hill C.M., 1996).

Monozyten sind das Hauptreservoir des sezernierten Interleukin-1. Sie produzieren vor allem IL-1 β . Interleukin-1 β hat über seine unterstützende Funktion im Rahmen der T-Zellaktivierung hinaus eine Vielzahl weiterer biologischer Eigenschaften (Cominelli F., 1989; Dinarello C.A., 1993), indem es die Aktivierung und Differenzierung von B-Lymphozyten fördert. Weiterhin vermag IL-1 β die Sekretion in immunologische

Aktivierungsprozesse eingreifender Faktoren wie Interferon- γ , Interleukin-2 oder Interleukin-6 zu induzieren. Interleukin-1 hemmt das Wachstum von Endothelzellen in vivo und in vitro. Es verursacht Alterationen der Endothelfunktion in vivo und unterstützt thrombotische Prozesse. IL-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose und Vaskulitis. IL-1 verstärkt die Adhäsion von Neutrophilen, Monozyten, T- und B-Zellen durch die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) und ELAM (endothelial leukocyte adhesion molecule). IL-1 in Kombination mit anderen Zytokinen ist eine wichtige Komponente der Entzündungsreaktion: so verstärkt es z.B. in Endothelzellen den Metabolismus der Arachidonsäure. Außerdem wurde eine vermehrte Sekretion von Entzündungsproteinen wie Kollagenase, Elastase und Plasminogen Aktivator beobachtet. (Dinarello C.A.; 1996 und 1997)

Viele der biologischen Eigenschaften des Interleukin-1 überlappen sich mit denen des Tumor Nekrose Faktor- α (Dinarello C.A., 1992). TNF- α induziert bei Endothelzellen die Bildung von PDGF (Hajjar K.A., 1987), IL-1 bei Zellen der glatten Muskulatur. PDGF kann Fibroblasten und Zellen der glatten Muskulatur zur Proliferation anregen.

TNF- α wird sezerniert von Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen und T-Zellen meist nach Stimulation mit LPS. TNF- α in Kombination mit IL-1 ist für verschiedene Alterationen des Endothels verantwortlich. Es hemmt antikoagulatorische Mechanismen und verstärkt thrombotische Prozesse bei der Atherosklerose, Vaskuliden und der disseminierten intravasalen Gerinnung. TNF- α ist ein potenter chemotaktischer Faktor für Neutrophile und verstärkt ihre Adhärenz an das Endothel. Obwohl TNF in vitro das Wachstum der Endothelzellen hemmt ist es in vivo ein potenter Angiogenese Faktor. TNF- α induziert die Synthese von IL-1. (Tracey K.J., 1990; Neta R., 1992)

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zelltypen produziert. Der Hauptteil wird von stimulierten Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches die antigenspezifische Immunantwort beeinflusst sowie die Entzündungsreaktionen. Es ist einer der wichtigsten physiologischen Mediatoren der „akuten Phase Reaktion“. IL-6 hemmt die Synthese von IL-1 und TNF (Akira S., 1990). (Hirano T., 1990; Wolvekamp M.C., 1990; Brach M.A., 1992)

4.5.1.2. Oberflächenmarker

Die Aktivierung von Monozyten führt zur Heraufregulierung von Rezeptoren auf deren Oberfläche, wie 1. muzin-ähnliche Moleküle, welche Selektine binden; 2. Integrine, welche Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin Superfamilie binden und 3. Rezeptoren, welche chemotaktische Moleküle binden. Zu den Integrinen gehören die CD11b-Rezeptoren, welche wahrscheinlich für die Adhäsion verantwortlich sind und vor allem auf aktivierten Monozyten/Makrophagen erscheinen. Dort treten sie zusammen mit CD11a (leucocyte function antigens = LFA-1) und CD11c auf. Sowohl CD11b als auch CD11c werden nach Aktivierung rasch exprimiert.

Inzwischen wurden zahlreiche Zelloberflächen-Glykoproteine an Leukozyten und Endothelzellen identifiziert. Diese Moleküle schließen eine Klasse von Adhäsionsfaktoren, den sogenannten Selektinen (E-, L- und P-Selektin) ein, welche die Monozyten stimulieren sich an das Endothel zu legen und einen Leukozytenwall zu bilden. Sie wirken zusammen mit der Immunglobulinfamilie der Zelladhäsionsmoleküle, welcher VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) und ICAM-1 angehören, die zu Anhaften und Ausbreitung der Monozyten führen.

ICAM-1 wird induziert durch veränderte Scherkräfte und Turbulenzen an den Endothelzellen. VCAM-1 wird im Endothel von Tieren mit erhöhtem LDL Cholesterol bzw. je nach Oxidationsstatus der Endothelzellen hochreguliert (Carlos T.M., 1990; Cybulsky M.I., 1991; Kim J.A., 1994).

4.6. Endothelzell-Monozyteninteraktionen

Generell werden 3 Schritte der Monozytenadhärenz an das Endothel unterschieden: 1. Die „rolling“ Phase, welche durch Selektine vermittelt wird und aus einer verlangsamten Bewegung der Leukozyten an der Oberfläche des Endothels besteht. Die anschließende sichere Adhärenz erfolgt mittels Vermittlung der β 2-Integrine wie z.B. ICAM-1. Diese Bindung erfordert die Aktivierung der Integrine durch Exposition der Neutrophilen gegenüber Aktivormolekülen wie IL-8 oder PAF (platelet aggregating factor). Letztendlich, erfolgt die Transmigration durch das Endothel, getriggert durch einen Gradienten chemotaktischer Faktoren. Oxidiertes LDL kann einer dieser chemotaktischen Faktoren sein. Die Adhärenz von Monozyten an das arterielle Endothelium in Arealen von niedrigem Scherstress war eine der ersten Veränderungen, die nach Cholesterol-Fütterung von Versuchstieren nachzuweisen war (Gerrity R.G., 1979).

Einer der spektakulärsten Effekte der Hypoxie auf Endothelzellen ist die Zunahme der Adhäsivität für Neutrophile (Milhoan K.A., 1992; Ginis I., 1993; Arnould T., 1993). Mehrere Autoren berichteten auch, dass die Hypoxie per se zu einer Zunahme der Expression von CD18/CD11b auf der Oberfläche mononukläerer Zellen führt und damit eine verstärkte Adhäsion an Endothelzellen verursacht (Scannell G., 1995; Simms H., 1995; Montoya M.C., 1997).

McCarron wies eine signifikant höhere Monozytenadhäsion an Endothelzellen spontan hypertensiver Ratten nach Stimulation mit LPS oder pro-entzündlichen Zytokinen wie Interferon- γ , Interleukin-1 β und TNF- α im Vergleich mit normotensiven Wistar Kyoto Ratten nach (McCarron R.M., 1994).

So ändern humane Endothelzellen ihr Expressionsmuster von Monozyten bindenden Adhäsionsmolekülen unter dem Einfluss von pro-entzündlichen Zytokinen (Swierlick R.A., 1992). Auch liegen einige Adhäsionsmoleküle im Serum von Hochdruckpatienten in erhöhter Konzentration vor (Blann A.D., 1994; DeSouza C.A., 1997; Dörffel Y., 2000).

Clozel berichtete über eine endotheliale Dysfunktion und subendotheliale Monozyteninfiltration bei SHR (Clozel M., 1991). Eine gesteigerte subendotheliale Akkumulation von Monozyten bei SHR im Vergleich mit normotensiven WKY konnte auch Liu (Liu Y., 1996) nachweisen.

Die Hypertonie scheint die Empfindlichkeit des Endothels für Faktoren, welche die Monozytenadhäsion unterstützen, zu verstärken (McCarron R.M., 1994).

4.7. Hypertonie und Arteriosklerose

Die Hypertonie gehört zu den führenden Risikofaktoren bei der Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßwandläsionen (Kannel W.B., 1986; Stamler J., 1989; Simon A., 1995; Violi F., 1996). In den industrialisierten Ländern ist die Hypertonie heute sogar der bedeutendste Risikofaktor für die Arteriosklerose, da sie Schrittmacher ist für die in der Morbiditäts- und Mortalitätsstatistik mit Abstand an erster Stelle stehenden zerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen.

Das „Internationale Atherosclerosis Project“ war eine der ersten Studien, welche schwerere und diffus auftretende arteriosklerotische Läsionen bei Hypertonikern im Vergleich mit Normotonikern nachwies (McGill H.C., 1968). Klinische und experimentelle Daten zeigen, dass hoher Blutdruck die Entwicklung der Arteriosklerose fördert, insbesondere eine erhöhte Inzidenz zerebrovaskulärer Erkrankungen und der koronaren Herzkrankheit lassen sich nachweisen (Cagan A.R., 1976; Kannel W.B., 1980; Rossi G.P., 1992).

Nach der Framingham Studie besteht ein zwei- bis vierfach höheres Risiko, ein schweres kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden, bei den 35-64 jährigen Patienten mit Hypertonie im Vergleich zu Normotonikern (Kannel W.B., 1993).

Tierexperimente belegen, dass der Hypertonus die Lipid-induzierte Atherosklerose verstärkt und die Reduktion des Blutdruckes eine Regredienz der pathologischen Veränderungen bewirkt (Chobanian A., 1990).

Die SHEP Studie konnte zeigen, dass bei älteren Patienten mit isolierter systolischer Hypertonie, die medikamentöse antihypertensive Therapie zur Reduzierung der Inzidenz von Apoplexen sowie kardiovaskulären Ereignisse führt (SHEP Cooperative Research Group, 1991).

Metaanalysen von Moser aller großen klinischen Interventionsstudien der Hypertonie zeigten eine Abnahme der zerebrovaskulären Morbidität und Mortalität um 38 % gegenüber einer nur 16 % igen Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse (Moser M, 1999). Daraus ist abzuleiten, dass Blutdruck und zerebrovaskuläre Morbidität eng miteinander korrelieren, die kardiovaskuläre Morbidität dagegen, von vielen weiteren Faktoren, wie Nikotinabusus, LDL, Alter usw. abhängig zu sein scheint.

Arteriosklerose und Hypertonie sind verschiedene Krankheitsentitäten. Nicht bei jedem Patienten, der an einer Hypertonie leidet, muss sich eine extensive Arteriosklerose manifestieren, andererseits tritt die Arteriosklerose keinesfalls immer mit einem Hypertonus auf.

Die Atherosklerose ist ein ungleichmäßig nodulärer Typ der Arteriosklerose. Die Läsionen werden häufig als frühe Läsion (Initialläsionen und Fettstreifen), Intermediärläsionen, fibröse Plaques und komplizierte Läsionen klassifiziert. Initial- und Intermediärläsionen können nur chemisch oder mikroskopisch entdeckt werden. Fibröse Plaques sind palpable erhöht Bereiche einer Intimaverdickung. Die komplizierte Läsion ist eine kalzifizierte fibröse Plaque.

Die Hypothese “Response to injury“ ist die allgemein akzeptierte pathogenetische Theorie der Atherosklerose, die mit einer Vielzahl experimenteller Beweise übereinstimmt. Nach diesen Vorstellungen sind die die Intima auskleidenden Endothelzellen wiederholten oder kontinuierlichen Angriffen auf die Integrität ausgesetzt.

Als Resultat finden sich kleinste Veränderungen der arteriellen Endothelzellauskleidung sowie der zirkulierenden Monozyten. Diese geringen Verletzungen des Endothels können zu funktionellen Veränderungen der Zellen und zu einer gesteigerten Monozytenadhärenz führen. Das Anhaften von Monozyten an alterierte Endothelzellen und deren Migration in die Arterienwand, um sich zu ortsständigen Makrophagen zu entwickeln, scheint die früheste zelluläre Anomalie in der Atherogenese zu sein (Ross R., 1993).

Die Hauptmerkmale der Entwicklung einer arteriosklerotischen Läsion sind:

- die Ansammlung von Monozyten/Makrophagen und T-Zellen
- ihre Lokalisation innerhalb der Arterien in Arealen mit niedrigem Scherstress

- die Proliferation von Zellen glatter Muskulatur in der Media
- die zunehmende Ablagerung von Bindegewebe
- die Neovaskularisierung (Griendling K.K., 1994)

Die Hypertonie und Artherosklerose sind durch eine verstärkte Rekrutierung mononukleärer Zellen in der Intima charakterisiert (Chobanian A.V., 1996). Arterien von Hypertonikern sind verdickt, die Zellen der glatten Muskulatur können vermehrt sein und es findet sich eine erhöhte Ablagerung von Bindegewebe. In der Tat ist die mit der Hypertonie vergesellschaftete Arteriosklerose charakterisiert durch eine entzündliche, proliferative Reaktion der Gefäßwand (Ross R., 1993).

In Anbetracht der Interaktionen der beiden Erkrankungen scheint es sinnvoll, Mechanismen anzunehmen, die beiden gemeinsam sind. So wurde im Tierexperiment bereits die Hypertonie-bedingte Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren und Zytokinen nachgewiesen, welche zu der Zellanhäufung in Plaques beitragen kann (Sarzani R., 1989).

Die Ursachen, die zu einer erhöhten Inzidenz der Arteriosklerose bei Hypertonikern führen, konnten bisher nur unvollständig geklärt werden. Zu den potentiellen Mechanismen gehören: eine endotheliale Dysfunktion, eine erhöhte Permeabilität des Endothels für Lipoproteine, eine erhöhte Adhärenz mononukleärer Zellen, erhöhter oxidativer sowie hämodynamischer Stress, welcher eine Plaqueruptur triggern kann (Blann A.D., 1993; Frostegard J., 1998; Tummala P.E., 1999).

Der zentrale Angriffspunkt beider Erkrankungen scheint das Endothel zu sein. Die Hypertonie ist assoziiert mit morphologischen und funktionellen Alterationen des Endothels. Die morphologischen Veränderungen beinhalten die subendotheliale Akkumulation von Fibrin, zelluläre Infiltrationen sowie eine Schwellung der

Endothelzellen. Funktionell alteriert sind die Endothel-abhängige Regulation des Gefäßtonus, einschließlich der NO, Endothelin und Cyclooxygenase vermittelten Prozesse (Susic D., 1997).

Die Arteriosklerose wird laut Ross heute als eine inflammatorische Erkrankung angesehen (Ross R., 1999). Atherogene Stimulanzen, wie erhöhte LDL-Konzentrationen scheinen die Entzündungsreaktion durch die Expression mononukleärer Leukozyten rekrutierender Mechanismen auszulösen. So wird das Gen für VCAM-1 partiell von Transkriptionsfaktoren, welche durch oxidativen Stress reguliert werden, kontrolliert (Marui N., 1993). Parallel dazu wurde bewiesen, dass die Hypertonie ebenfalls oxidativen Stress auf die Arterienwand ausübt. Andererseits kann die Hypertonie den bereits initiierten Prozess durch eine weitere Druckschädigung des Endothels verstärken.

Interessanterweise war die Anzahl von Atheromen in autopsierten Aortenwänden bis zum 50. Lebensjahr der Patienten gleich unabhängig davon, ob eine Hypercholesterinämie vorlag oder nicht. Allerdings lag die Frequenz der Atherome bei Hypertonikern deutlich über der von Normotensiven (Homma S., 1997). Als geeigneter Indikator zur Beurteilung des Arterioskleroserisikos wird heute jedoch der LDL-HDL-Index gewertet.

In den letzten Jahren wurde uns mit dem hochauflösendem Ultraschall die Möglichkeit gegeben, artherosklerotische Plaques beim Menschen in vivo mit einer nicht invasiven Methode nachzuweisen. Bereits eine Zunahme der Intima-Mediadicke lässt sich so sonographisch nachweisen.

Tatsächlich scheint die Arteriosklerose nur in den Teilen des Gefäßsystems vorzukommen, die hohen Drücken ausgesetzt sind. Fry geht davon aus, dass veränderte Flusscharakteristika bei Hypertonikern insbesondere im Bereich von Gefäßaufzweigungen zu Endothelläsionen führen (Fry D.L., 1976).

Zusammenfassend kommt den, die chronische Entzündungsreaktion bei der Arteriosklerose einleitenden Faktoren aus therapeutisch-diagnostischer Sicht eine gleichwertige oder sogar größere pathophysiologische Bedeutung zu als den ursächlichen, die Erkrankung auslösenden, immunologischen Ereignissen. Dabei stehen die mononukleären Phagozyten am Anfang der Immunkaskade. Sie sind daher für die Auslösung der immunologischen Reaktion möglicherweise von hoher Relevanz.

5. Problemstellung

Trotz zahlreicher Hinweise auf immunologische Alterationen bei der Hypertonie, wie erhöhter Immunglobulinspiegel im Serum, vermehrter Autoantikörper oder einer verzögerten Überempfindlichkeit auf vaskuläre Antigene wurde die Rolle peripherer Monozyten als immunkompetenten Zellen bei essentiellen Hypertonikern bisher nicht untersucht.

Ungeklärt ist bis heute, ob die Monozyten essentieller Hypertoniker einen erhöhten Aktivitätszustand aufweisen, ob sie an der vermehrten Superoxidproduktion und/oder der vorzeitigen Arteriosklerose beteiligt sind.

Tierexperimentelle Daten sprechen dafür: so ist die Anzahl aktivierter Monozyten bei SHR gegenüber der von WKY signifikant erhöht (Schmid-Schönbein G.W., 1991) und die subendotheliale Akkumulation von Monozyten bei SHR gesteigert (Clozel M., 1991; Liu Y., 1996). Bataillard konnte sogar zeigen, dass die in vivo Gabe von Silica, einem selektiven Monozytentoxin, den Hypertoniegrad bei Lyon hypertensiven Ratten reduziert (Bataillard A., 1995).

In der vorliegenden Arbeit werden daher folgende Aufgaben bearbeitet:

- Immunologische Charakterisierung des Aktivierungszustandes peripherer Monozyten von essenziellen Hypertonikern im Vergleich zu Monozyten gesunder Probanden
 - Untersuchung der Sekretion pro-entzündlicher Zytokine mit und ohne Stimulation auf Protein- und RNA-Ebene, Bestimmung der Superoxidproduktion, Identifikation aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle,
 - Untersuchung der Hemmbarkeit der Aktivierung in vitro

- Charakterisierung des Adhäsionsverhaltens peripherer Monozyten von essenziellen Hypertonikern an Endothelzellmonolayer im Vergleich mit Monozyten gesunder Kontrollen
 - Untersuchung der Adhäsion mit und ohne Stimulanzen und der Hemmbarkeit in vitro

6. Material und Methoden

6.1. Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien, die für die Isolierungen und Experimente verwendet wurden, waren Endotoxin-frei (Endotoxin < 0,01 ng/ml). Endotoxin-freies fetales Kälberserum (Endotoxin < 0,002 ng/ml) wurde von Biochrom KG/Seromed (Berlin) bezogen. Endothelzellmedium M-199 wurde von Bio Whittaker (Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg) und Endothelzellwachstumsmedium (ECGM) von Promocell (Heidelberg) bezogen. PBS (Phosphate Buffered Saline) wurde von Dulbeco (Biochrom KG/Seromed, Berlin) geliefert. Ficoll-Histopaque wurde von Pharmacia (Uppsala, Schweden) bezogen. Die AT1-Rezeptorantagonisten Losartan und Eprosartan wurden von MSD (Haar) bzw. Hoechst Marion Roussel (Bad Soden/Taunus) zur Verfügung gestellt. Die IL-1 β und IL-6 ELISA wurden über R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) bezogen und der TNF- α ELISA über Medgenix Diagnostics (Fleurus, Belgien) bezogen. Na⁵¹Cr wurde von Nycomed Amersham (Amersham, UK) geliefert. Der Faktor VIII Kit zur Identifizierung der Endothelzellen kam von der Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA). Die Adhäsionsmolekül-Assays wurden von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) bezogen. Fluoreszenzmarkierte und nicht markierte monoklonale Antikörper für die Flusszytometrie wurden von DAKO (Dänemark) bzw. Pharmingen / Becton-Dickinson (Mountainview, CA) bezogen. Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde von Boehringer Ingelheim GmbH (Ingelheim) verwendet. Alle übrigen Produkte waren von Sigma Chemical Co. (St. Louis, MI, USA), falls nicht anders angegeben.

6.2. Periphere Monozyten

6.2.1. Isolierung der Monozyten aus dem peripheren Blut

Die mononukleären Zellen wurden aus dem peripheren Blut von Patienten mit essentieller Hypertonie sowie gesunden Normalpersonen gewonnen und präpariert (Boyum A., 1968; Dörffel-Rückert Y., 1996). Dieses Vorgehen war durch die zuständige Ethikkommission (Charité) gebilligt worden. Es wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes durch Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Histopaque abgetrennt. Dazu wurden jeweils ca. 100 ml heparinisiertes (100 U Heparin/ml) venöses Blut mit PBS (1:1) verdünnt und dann über Ficoll-Histopaque (SG = 1,077) geschichtet und für 40 min bei 400 g zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde die Zwischenschicht (Interface, Abb. 2) entnommen und mehrfach mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen sowie anschließend je nach weiterem Isolierungsverfahren in RPMI 1640 (Roosevelt Park Memorial Institute - Medium) mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) bzw. PBS mit 0,1 % HSA resuspendiert.

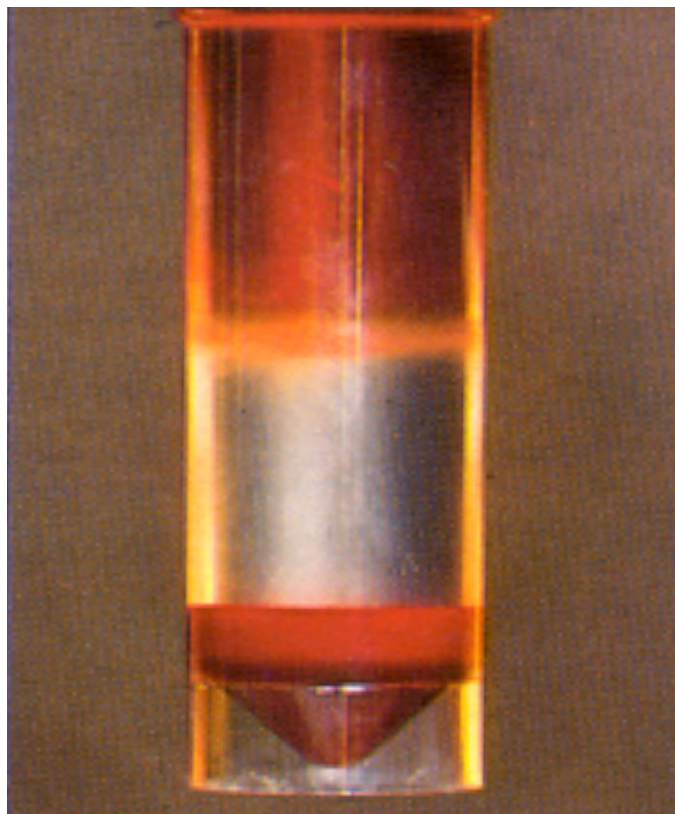


Abb. 2 Abtrennung der mononukleären Zellen mit Ficoll-Histopaque. Bei der Dichtegradientenzentrifugation setzen sich die Erythrozyten und Granulozyten am Boden des Röhrchens ab, da ihre Dichte höher als die von Ficoll (weiß) ist. Die mononukleären Zellen reichern sich in einer schmalen Zwischenschicht zwischen Plasma (oben, rot) und Ficoll an.

Zur Isolierung von Monozyten mittels Plastikadhärenz wurden mononukleäre Zellen in Kulturmedium auf positiv geladenen Gewebekulturschalen inkubiert (1h, 37°C, 5 % CO₂, 95 % O₂). Nicht adhärente Zellen wurden durch vorsichtiges Spülen mit Medium (RPMI 1640, 37°C) abgetrennt und verworfen. Die verbleibenden adhären Zellen wurden mechanisch mittels Zellschaber (Nunc, Roskilde, Dänemark) in kaltem HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, ohne Ca²⁺/Mg²⁺) gelöst. Anschließend wurden die adhären Zellen mehrfach in HBSS gewaschen und in RPMI 1640 (mit 10% FCS, 100 E/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin) für Zellkulturexperimente resuspendiert.

Zur Verifizierung des ersten Isolierungsverfahrens wurden die peripheren Monozyten auch mittels magnetischer Trennung durch Dynabeads® (DynaL, Oslo, Norwegen) isoliert. Dazu wurde zu den in PBS resuspendierten mononukleären Zellen Gammaglobulin als blockende Reagenz sowie ein monoklonales Maus Immunglobulin G gegeben und alles für 10 min bei 5°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang mit PBS (0,1 % HSA) und die Zentrifugation für 8 min bei 500 g. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen resuspendiert und zu den gewaschenen Dynabeads® (100 µl pro 1 Mio mononukleäre Zellen) gegeben. Die Inkubation erfolgte rotierend für 15 min bei 5°C.

Nach Resuspendierung der Rosetten wurde ein Magnetpartikelkonzentrator zur Abtrennung der Lymphozyten verwendet. Die Monozyten befanden sich dann im Überstand.

Die Vitalität der Monozyten wurde entweder mit Trypanblaufärbung (lichtmikroskopische Anwendung) oder Propidiumjodid (Auswertung im fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometer) gemessen. Die Vitalität betrug typischerweise > 95 %.

6.2.2. Identifikation der Monozyten aus dem peripheren Blut mittels fluoreszenzaktiviertem Flusszytometer

Die Monozyten wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung von Zelloberflächenantigenen identifiziert. Es wurden monoklonale Mausantikörper von DAKO A/S (Dänemark) verwendet, welche spezifisch waren für humane T-Zellen (CD3; Klon UCHT1, Code F0818, RPE (R-Phycoerythrin)-konjugiert), humane B-Zellen (CD19; Klon HD37, Code F0768, RPE-konjugiert) bzw. humane Monozyten (CD14; Klon TÜK4, Code R0864, FITC (Fluoreszinisothiocyanat)-konjugiert).

Die Monozyten wurden mit den spezifischen (s.o.) fluoreszierenden Antikörpern versetzt und in eine vibrierende Fließkammer gegeben. Der Zellstrom wurde an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, wobei im Durchlicht die Größe jeder einzelnen Zelle, die Granularität in einer 90°-Ablenkung des Lichtstrahls, ferner rote und grüne Fluoreszenz und damit verschiedene Oberflächenmarker gemessen wurden. Durch die Vibration wurde der Zellstrom in feine Tröpfchen verteilt, die aufgeladen und unter Computerkontrolle durch Ablenkungsplatten nach den zu messenden Parametern sortiert wurden. Eine geeignete Antikörperkontrolle lief stets mit, um unspezifische Färbungen anzuzeigen.

Die Analyse erfolgte mittels fluoreszenzaktiviertem Flusszytometer (FACSalibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA). Der Computer errechnete nach Subtraktion der Kontrollen von den Fluoreszenzprofilen die relative Frequenz von Zellen, welche die verschiedenen Oberflächenantigene exprimierten.

Die Zellsuspension enthielt in der Regel 2 % CD3 positive Zellen, 3 % CD19 positive Zellen und 93 % CD14 positive Zellen.

6.2.3. Stimulation peripherer Monozyten und Zellkultur

Periphere Monozyten wurden in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in RPMI 1640 (supplementiert mit 10 % FCS, 1 % Pyruvat, 100 E/ml Penicillin, 100 μ l/ml Streptomycin und 50 μ l/ml Gentamycin) bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden in 24 Loch-Gewebekulturplatten (Nunc) entweder mit oder ohne Stimulation kultiviert.

Die optimalen Bedingungen und Konzentrationen für die Stimulation der Monozyten in Kultur mit LPS und Angiotensin II wurden mittels Zeit- und Konzentrationskinetiken ermittelt. In diesen Voruntersuchungen fanden wir, dass die Konzentration der pro-entzündlichen Zytokine im Zellkulturüberstand nach 24 Stunden ein Plateau erreichte, nach 4-6 Stunden war im ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) eine vermehrte Zytokinproduktion nachweisbar.

LPS wurde als Monozytenstimulans gewählt, da es in Vorversuchen erheblich stärker stimulierte als Pokeweed-Mitogen (Gibco) oder Concanavalin A. Die Konzentrationskinetiken zeigten bereits eine massive Stimulierung der pro-entzündlichen Zytokine ab 10 ng LPS/ml, welche bis zu 1000 ng LPS/ml noch steigerbar war. Aufgrund der toxischen Eigenschaften von LPS verwendeten wir die niedrigere Konzentration.

Angiotensin II stimulierte die Monozyten ab einer Konzentration von 10^{-10} mol/l minimal und bei Konzentration von 10^{-6} bis 10^{-8} optimal.

In zusätzlichen Experimenten wurden die Monozyten in Gegenwart der AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan (10^{-8} mol/l) bzw. Eprosartan (10^{-6} mol/l) für 30 min vorinkubiert.

Nach 20 Stunden wurden die Kulturüberstände von den Zellen durch Zentrifugation separiert, schockgefroren (Flüssigstickstoff) und bei – 70°C bis zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen aufbewahrt.

6.3. Zytokinassays

Die Konzentrationen von Interleukin-1 β und Interleukin-6 wurden in Kulturüberständen mittels spezifischer Sandwich ELISA (R&D Systems) bestimmt, der Gesamtgehalt an TNF- α wurde mit einem ELISA von Medgenix Diagnostics bestimmt (Dörffel Y., 1999).

Das Prinzip des Sandwich ELISA besteht darin, dass die Testplatten bereits mit einem spezifischen, immobilisierten Zytokinantikörper beschickt wurden. Die Standards oder Proben werden nun in die Plattenlöcher pipettiert, dabei bindet das darin vorhandene Zytokin an den immobilisierten Antikörper. Nach Auswaschen von allem ungebundenen Protein, wird ein polyklonaler Antikörper, welcher an ein Enzym gebunden ist und spezifisch für das entsprechende Zytokin ist, zugegeben. Damit wäre das sogenannte Sandwich komplett. Das Enzym führt nach Zusetzen einer Reagenz zur Farbreaktion je nach Zytokinkonzentration, welche photometrisch ermittelt wird.

Alle Proben wurden zumindest in Duplikaten analysiert. Kreuzreaktivitäten wurden durch Probenverdünnungsstudien abgeschätzt. Die Spezifität der ELISA-Systeme wurde durch Zusatz von bis zu 100 pg/ml Interleukin-1, Interleukin-2, Interleukin-3, Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-6, Interleukin-8, Interleukin-10 und TNF- α untersucht (Bienvenu J., 1993). Die Intra- und Inter-Assaypräzision lag über 97 %. Die Sensitivität lag zwischen 0,3 pg/ml für IL-1 β und 3,0 pg/ml für TNF- α .

6.4. Zytokin mRNA Bestimmungen

6.4.1. Extraktion der RNA

Die RNA wurde nach 4-6 Stunden mittels eines kommerziellen Kits (RNAeasy, Quiagen GmbH, Hilden), welcher modifiziert der Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion nach Chromczynski entspricht, gewonnen (Chromczynski P., 1987).

Zusammenfassend wurden die Zellen – nach Entfernung des Kulturüberstandes und Waschen – in Guanidium Lösung lysiert (4 M Guanidiumthiocyanat, 25 mM Na-Zitrat, 0,5 % Sarcosyl, 0,1 M 2-Mercaptoethanol, pH 7,0). Nach Entfernung der zellulären DNA wurden 0,1 Volumenteile 2 M Na-Acetat (pH 4,0) und 1 Volumenanteil H₂O-gesättigtes Phenol sowie 0,2 Volumenanteile Chloroform:Isoamylalkohol (49:1) sequenziell hinzugefügt. Diese Lösung wurde auf Eis inkubiert (15 min) und anschließend zentrifugiert (5 min, 12000g). RNA ist in der wässrigen Phase enthalten. Nach erneuter Zentrifugation wurde mittels Quiagen-Säule die RNA von der wässrigen Phase extrahiert und mit Ethanol über Nacht präzipitiert (- 20°C).

Nach Zentrifugation (20 min, 12000g) wurde das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und die RNA in sterilem H₂O (mit 0,1 % Diethyl-Pyrocbonat vorbehandelt) resuspendiert. Die RNA-Menge und Reinheit wurden mittels Spektrophotometrie und Agarose-Gel-Elektrophorese (1 %) bestimmt.

6.4.2. Reverse Transkription (RT)

Für die semiquantitative RT-PCR wurde ein cRNA Standard (Perkin Elmer Cetus, NJ, USA) verwendet, der eine Vielzahl von Primer-Bindungsstellen (u.a. TNF- α und IL-1 β) enthält. Das Gewicht des co-amplifizierten internen Standards (ca. 300 bps) erlaubte über die Größe des Amplifikationsproduktes eine einfache Unterscheidung des Standards vom PCR-Produkt der Wild-Typ (authentischen) Zytokin mRNA der Probe. Zelluläre RNA, die wie oben beschrieben isoliert worden war und die authentische (Wild-Typ) RNA für TNF- α und IL-1 β enthielt, wurde mit verschiedenen Konzentrationen des synthetischen cRNA Standards gemischt. Aliquots dieser Mischung wurden revers transkribiert.

Die Einzelstrang-cDNA wurde transkribiert aus 3 µg RNA mit 500 ng Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (Gibco-BRL, Life-Technologies GmbH, Eggenstein) in einem Gesamtvolumen von 20 µl: 50 mmol/l Tris-HCl, 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l DTT und 1 mmol/l jedes Desoxyribonukleotides sowie 200 E Superscript II reverse Transkriptase (Gibco-BRL) enthaltend. Anschließend erfolgte die Inkubation der Reagenzien bei 42°C für 1 Stunde zur Gewinnung der komplementären DNA.

In Vorexperimenten war bestätigt worden, dass äquimolare cDNA Konzentrationen aus authentischen Zytokin RNA und synthetischen Standard über die relevante Zahl von Zyklen mit gleicher Effizienz amplifiziert werden (Abb. 3). Die Voruntersuchungen zur Amplifikationskinetik wurden bei verschiedenen Konzentrationen und für jedes der untersuchten Zytokine durchgeführt.

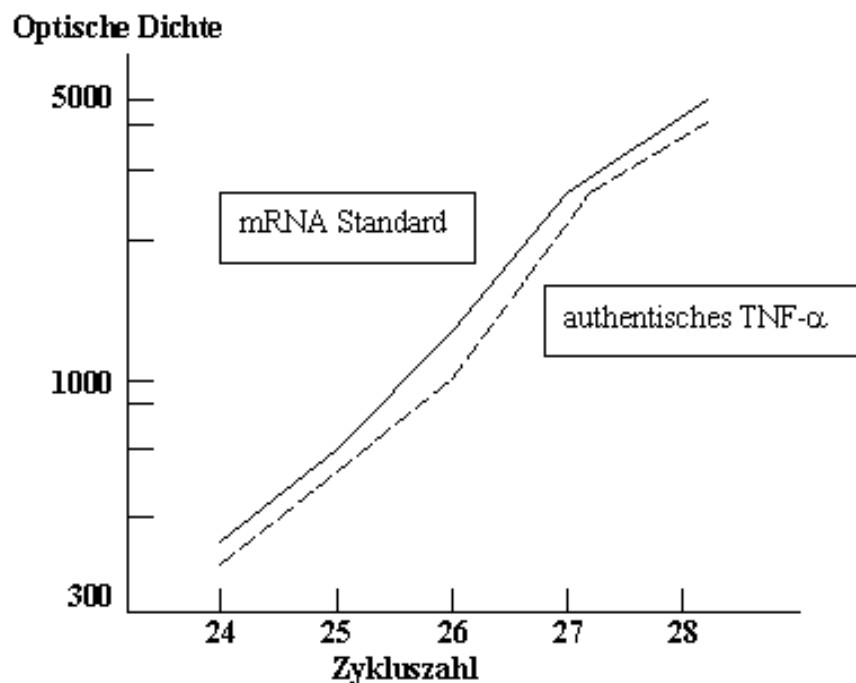


Abb. 3 Amplifikationskinetik TNF-α-Primer. Über der relevanten Zykluszahl finden sich parallele Amplifikationskinetiken für authentisches TNF-α und synthetischen Standard

6.4.3. Semiquantitative Polymerasekettenreaktion

Die Amplifikation erfolgte in Anlehnung an die von Wang beschriebene Methode (Wang A.M., 1989). Es wurde eine Amplifikation mit 25 Zyklen für beide Zytokine ausgewählt, da über den relevanten Bereich eine lineare und parallele Verstärkung vorlag (24-27 Zyklen für TNF- α (Abb. 3) und 23-27 Zyklen für IL-1 β). Die folgenden Primer-Paare (Perkin Elmer Cetus) wurden verwendet:

TNF- α : 5'-CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG-3' und

5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'

IL-1 β : 5'-AAACAGATGAAGTGCTCCTTCCAGG-3' und

5'-TGGAGAACACCACTTGTTGCTCCA-3'

Es wurden 2 μ l der komplementären DNA (entsprechend ca. 300 ng RNA) zu einer Lösung aus: 10 μ l PCR-Puffer (200 mmol/l Tris-HCl (pH 8,4), 500 mmol/l KCl), 3 μ l MgCl₂ (50 mmol/l), 2 μ l dNTP (10 mmol/l), je 1 μ l der 5' und 3' Primer (25 μ M), 5 E Taq DNA Polymerase und 80 μ l destilliertes Wasser gegeben.

Die PCR-Bedingungen waren die Folgenden: Die Doppelstrang-DNA wurde bei 94°C aufgetrennt, die Annealingtemperatur (komplementäre Anlagerung der Primer an Zielregion) lag bei 62°C für je 1 min, die Verlängerung der Primer entlang der DNA-Matrize erfolgte bei 72°C.

Der Upstream Primer wurde am 5'Ende an ein Fluoresceinmolekül gekoppelt. Das PCR Produkt wurde in Formamid verdünnt (mit 50 mM EDTA, 1:3) und mit einer denaturierenden 6% Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis des synthetisierten PCR Produkts erfolgte mit einem DNA Sequenzierautomaten (Applied Biosystems), der das an das 5'-Ende des Primers gekoppelte Fluoresceinmolekül über einen Argon Laser anregte. Die gescannten Rohdaten wurden mit dem Programm "gene

scan“® (Applied Biosystems) analysiert. Die Abschätzung der enthaltenen authentischen RNA Konzentration erfolgte in der Probe, in der Konzentrationen der PCR Produkte von synthetischem Standard und authentischer RNA am ehesten äquimolar waren.

6.5. Chemilumineszenz-Assay und Stimulation der Zellen

Neben spezifischen pro-entzündlichen Mediatoren sezernieren aktivierte Monozyten eine Reihe unspezifischer Effektormoleküle wie z.B. Sauerstoffsuperoxid. Mittels Chemilumineszenz wurde die Superoxidproduktion von peripheren Monozyten und humanen Umbilikalvenenendothelzellen analysiert.

Die Monozyten wurden in RPMI 1640 resuspendiert (10^6 Zellen/ml) und bis zur anschließenden Verwendung auf Eis gelagert. Die Freisetzung von Sauerstoffsuperoxid wurde durch PMA induziert. PMA (8×10^{-5} mol/l) wurde in DMSO gelöst und bei -70°C aufbewahrt. Jeweils 10^5 Monozyten wurden mit Angiotensin II (10^{-8} mol/l) oder LPS (10 ng/ml) und PMA stimuliert bzw. unstimuliert verwendet. Die Sauerstoffsuperoxidproduktion von Monozyten der Hochdruckpatienten wurde mit der der Kontrollen verglichen.

Konfluente HUVEC in Petrischalen von 20 cm^2 wurden dreimal mit einem modifizierten Krebs-Puffer gewaschen (Pueyo M.E., 1998). Die Superoxidfreisetzung der HUVEC wurde nach Stimulation mit Angiotensin II (10^{-8} mol/l) ermittelt. Bei Verwendung des AT1-Antagonisten Eprosartan, erfolgte die Zugabe desselben 30 min vor Beginn der Experimente. Jeweils ca. 10^5 HUVEC wurden mittels Zellschaber abgekratzt und in eine Luminometer-Küvette gegeben.

Als Chemilumineszenz-Substrat wurden jeweils 10 µl Lucigenin ($2,5 \times 10^{-4}$ mol/l) zugegeben. Alle Prozeduren wurden im Dunkeln durchgeführt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C wurden die Küvetten in einen CL analyzer Lumat LB 9501

(Berthold, Bad Wildbad) gegeben. Die Messungen erfolgten alle 30 s für 2 Stunden (bis zu 24 Stunden). Die Werte ergaben sich aus der Differenz zwischen der stimulierten und unstimulierten Chemilumineszenz. Jede Messung wurde zweifach durchgeführt und das arithmetische Mittel wurde zu statistischen Zwecken verwendet.

6.6. Adhäsionsmoleküle

6.6.1. Bestimmung der Adhäsionsmoleküle mittels ELISA

Serumproben von Patienten und Kontrollen für die Bestimmung der Konzentrationen von zirkulierendem sICAM-1, sVCAM-1 und sE-Selektin wurden gesammelt. Die Seren wurden im Zweifachansatz mittels kommerziellem monoklonalen Antikörper ELISA (R&D Systems) analysiert (Prinzip s. 6.3.). Der Intra-Assay Variationskoeffizient betrug für sICAM-1 und sE-Selektin jeweils 4,8 % und für sVCAM-1 5,9 %.

6.6.2. Identifikation aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle der Monozyten mittels FACS

Die Messung der aktivierungsabhängigen Oberflächenmoleküle auf peripheren Monozyten erfolgte unter Nutzung der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie (FACS-Calibur, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, CA). Die Monozyten wurden sofort nach der Isolierung und Stimulation mit verschiedenen FITC (CD11a, CD54, CD29) oder RPE (CD11b, CD31, CD44) -konjugierten Antikörpern markiert. Zur Erhöhung der Genauigkeit erfolgte jeweils eine Färbung mit CD14 (APC (Allophycocyanin)-markierter Antikörper) als Monozytenmarker. Nur die Fluoreszenz der CD14 positiven Zellen, die ein bestimmtes für lebende Monozyten typisches Muster im forward - und sideward scatter aufwies (zweifache Gates), wurde ausgewertet.

Zum Vergleich wurden Färbungen mit Isotyp-Antikörpern gegen IgG mitgeführt. Entsprechend der Fluoreszenz der Isotyp-Antikörper erfolgte die Wahl der Kompensation und Verstärkung des FACS. Die relative Intensität und Häufigkeit der Fluoreszenz, der mit den Oberflächenmolekülen markierten Monozyten, wurde mit dem Cellquest-Programm ausgewertet (Histogramm, Mittelwert der Fluoreszenz, Anzahl der Fluoreszenz positiven Zellen). Es erfolgte für jeden Versuch eine Auswertung der Isolationsreinheit durch Analyse der Zellgruppen.

Folgende aktivierungsabhängige Integrine bzw. Adhäsionsmoleküle wurden auf den peripheren Monozyten von Patienten und Kontrollen im Vergleich ausgewertet: CD11a (LFA-1) und CD11b (membrane attack complex-1 = MAC-1), CD54 (ICAM-1), CD62L (L-Selektin), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1 = PECAM-1), CD44 (Pgp-1 adhesion to matrix), CD49d (very late antigen-4 = VLA-4), CD 29 (VLA-1).

6.7. Humane Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC)

6.7.1. Isolierung der HUVEC

Die humane Umbilikalvenenendothelzellen wurden nach dem modifizierten Protokoll von Jaffe (Jaffe E.A., 1973) mittels Kollagenase isoliert. Unmittelbar nach der Entbindung wurden die Nabelschnüre in sterile Behälter gegeben, welche einen HEPES Puffer (0,14 mol/l NaCl, 0,004 mol/l KCl, 0,001 mol/l HEPES Puffer (pH 7,4), 0,011 mol/l Glukose) enthielten und bis zur Präparation bei 4°C aufbewahrt. Die Verarbeitung erfolgte innerhalb der nächsten 24 Stunden nach Entbindung.

Unter sterilen Bedingungen wurden die Umbilikalvenen mit Luerlock Konnektor (Sherwood Medical, Tullamore, Irland) kanüliert und mit 100 ml des HEPES Puffers gespült. An dem anderen Ende der Umbilikalvene erfolgte mittels Konnektor die Befestigung eines 4 cm langen Silikonröhrchens (0,8 cm Durchmesser). Zehn ml einer 0,2

% Kollagenase (Collagenase P, Boehringer Mannheim GmbH) in HEPES Puffer wurden dann für 20 min bei Zimmertemperatur in die präparierte Vene appliziert. Die Reaktion wurde beendet, indem 30 ml HEPES Puffer in die Vene gegeben wurden und die Endothelzellen in M-199 mit 20 % fetalem Kälberserum aufgefangen wurden.

6.7.2. Kultivierung der HUVEC

Die Umbilikalvenenendothelzellen wurden nach Zentrifugation bei 400g für 5 min in Endothellzellwachstumsmedium resuspendiert und auf 24 Loch-Gewebekulturplatten zu jeweils ca. 30000 Zellen pro 0,5 ml ECGM ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Alle 2-3 Tage wurden die Zellen durch Mediumwechsel gefüttert. Mittels Trypsin erfolgte ein- bis dreimalig die Subkultivierung, letztmalig 48 Stunden vor Verwendung der Zellen im Adhäsionsassay.

Es wurden humane Umbilikalvenenendothelzellen gesunder Mütter zur Vermeidung jeglicher Beeinflussung des Adhäsionsassays durch voraktivierte Endothelzellen verwandt. Es wurden nur Nabelschnüre verwendet, die ansonsten verworfen worden wären.

6.7.3. Identifikation der HUVEC

Die humanen Umbilikalvenenendothelzellen wurden immunhistochemisch mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung für den von Willebrand Faktor unter Verwendung von Anti-humanem vWF-FITC Konjugat (Factor VIII-related Antigen Staining Kit, Worthington Biochemical Corporation) identifiziert. Dabei wurden Methanol-fixierte mikrovaskuläre Endothelzellen als Positivkontrolle und Fibroblasten als Negativkontrolle verwendet. Eine Anfärbung der Zellmatrix der mikrovaskulären und umbilikalen Endothelzellen im

Gegensatz zu den Fibroblasten wurde mittels Epifluoreszenzmikroskop (Diaphot, Nikon, Japan) nachgewiesen (Abb. 4).

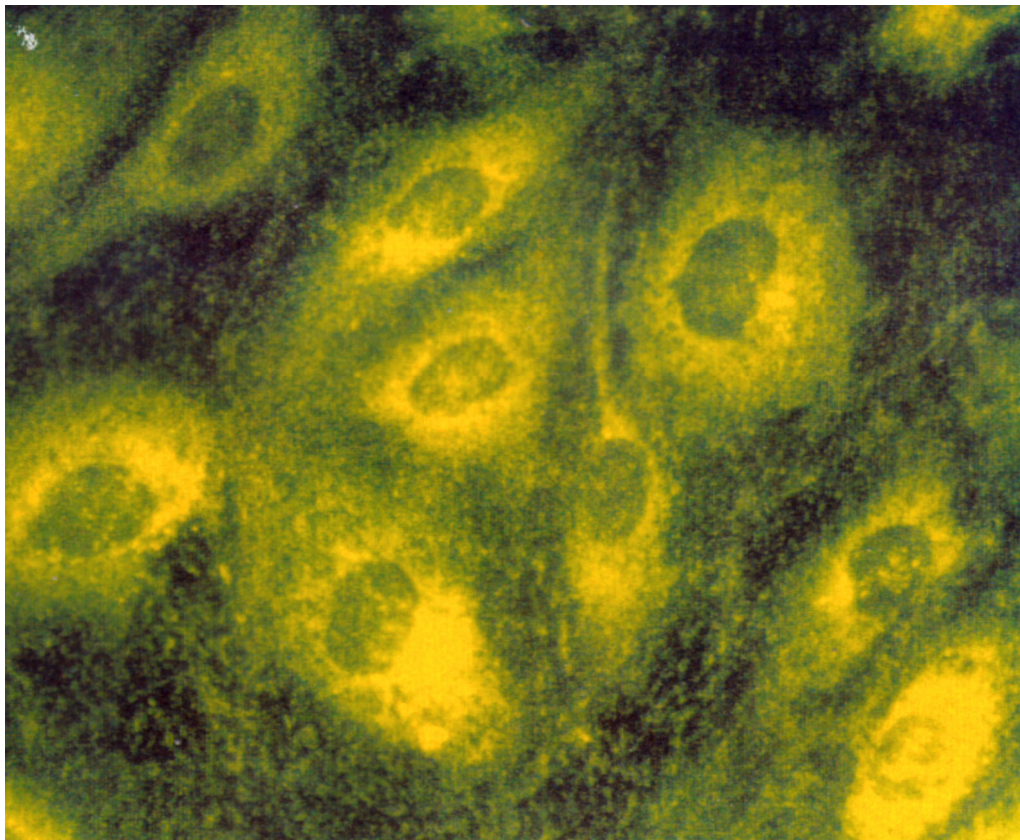


Abb. 4 Humane Umbilikalvenenendothelzellen nach direkter Immunfluoreszenzfärbung mit Anti-humanen vWF-FITC Konjugat.

6.8. Monozyten-Adhäsionsassays

Die Monozytenadhäsion an HUVEC wurde mit 2 verschiedenen Adhäsionsassays zur Qualitätskontrolle gemessen.

Zunächst wurde die Monozytenadhäsion, wie von Hahn und Kollegen 1994 beschrieben, modifiziert durchgeführt (Hahn A.W.A., 1994):

Bei den konfluierende HUVEC Monolayer wurde 2 Stunden vor Adhäsion das ECGM durch das Medium RPMI 1640 mit 1 % HSA ersetzt. Nach Inkubation der Monozyten für 24 Stunden wurden sie in RPMI 1640 (mit 1 % HSA) gewaschen und auf den

Endothelzellmonolayer ausgesät (1Mio Zellen/well). Die nicht-adhärenenten Monozyten wurden nach 2 Stunden aufgenommen und gezählt. Die Monozytenadhäsion ergab sich als Prozentsatz der initial ausgesäten Zellen.

Ein zweiter Adhäsionsassay nach McCarron wurde modifiziert zur Verifizierung des ersten Assays angewandt (McCarron R.M., 1994):

Dazu wurden die Monozyten mit 100 μ Ci Na⁵¹Cr/ml versetzt und in ein schüttelndes Wasserbad von 37°C für 1 Stunde gegeben. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert, mehrfach gewaschen und in M-199 Medium resuspendiert. Die Adhäsion der Monozyten (10⁵ Zellen/ml/well) an die Endothelzellmonolayer erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂ für 1 Stunde. Nach der Inkubation wurden die nicht-adhärenenten Zellen abpipettiert. Die Endothelzellmonolayer wurden wiederholt mit warmem M-199 gewaschen. Die adhärenenten Zellen wurden mit 2 % Triton-X (0,2 ml/well) über Nacht lysiert. Die Radioaktivität aller Fraktionen wurde mittels Gamma Counter (Packard gamma 5650 counter) gemessen. Der Prozentsatz der adhärenenten Zellen wurde anhand der Ausgangs- oder Totalaktivität pro Minute im Verhältnis zur Radioaktivität der adhärenenten Zellen pro Minute ermittelt.

6.9. Untersuchungen am Menschen

Insgesamt nahmen 81 Patienten mit essentieller Hypertonie (Alter: 19 bis 64 Jahre) und 74 gesunde Kontrollen (Alter: 19 bis 59 Jahre) an den Versuchen teil. Alle Patienten wurden in den Hypertoniesprechstunden der Medizinischen Poliklinik der Charité, Berlin, betreut. Jegliche Entnahme von venösem Blut während Routineblutentnahmen erfolgte freiwillig. Es wurde die revidierte Deklaration von Helsinki (41. Generalversammlung des Weltärztebundes in der revidierten Fassung vom September 1989, Hongkong) zur

Anwendung gebracht. Es wurden jedoch keine Heilversuche bzw. in vivo Experimente vorgenommen. Personenbezogene Daten wurden nicht gespeichert.

Die Gruppe der Patienten setzte sich aus essentiellen Hypertonikern vor medikamentöser Therapie bzw. ≥ 10 Tage nach Absetzen der antihypertensiven Therapie zusammen. Das mittlere Körpergewicht betrug $73 \pm 9,6$ kg und der "body mass index" (BMI) $24,4 \pm 1,5$ kg/m². Die Hypertonie wurde mittels 24 Stunden ABDM gesichert. Nur Patienten mit einem diastolischen Blutdruck zwischen 95 und 120 mmHg wurden eingeschlossen (mittlerer Blutdruck: 172/101 mmHg). Ausschlusskriterien waren alle anderen Erkrankungen sowie die sekundäre Hypertonie.

Als Kontrollgruppe wurden freiwillige, gesunde Blutspender verwendet. Das mittlere Körpergewicht betrug $70 \pm 7,1$ kg und der BMI $22,9 \pm 2,3$ kg/m². Patienten- und Kontrollgruppe wurden hinsichtlich Alter (mittleres Alter: Patienten 47, Probanden 45 Jahre) und Geschlecht (Patienten: 37 weiblich, 44 männlich; Probanden: 35 weiblich, 39 männlich) gematcht.

Patienten- und Probandenblut wurde nicht verwendet, wenn pathologische Laborwerte (K, Kreatinin, ASAT, ALAT, BSG, CRP, Gluc, Hb, Leukozyten, Thrombozyten, LDL (< 160 mg/dl); Tabelle 2) oder sonographische Veränderungen der Carotiden bzw. Aorta abdominalis (Plaques oder pathologische Intima-Media-Dicke ($> 0,80$ mm; Pit'ha J., 1999; Ferrieres J., 1999)) vorlagen. Patienten mit grenzwertiger Intima-Media-Dicke der Arteria carotis communis ($0,70 - 0,79$ mm; Aminbakhsh A., 1999; Simons PC, 1999) im hochauflösenden Sonogramm wurden nicht in die Adhäsionsversuche sowie Chemilumineszenzmessungen eingeschlossen (Abb. 5, Tabelle 3). Raucher wurden generell ausgeschlossen, um die Ergebnisse der Versuche nicht zu verfälschen.

Tabelle 2: Paraklinik der Patienten zum Zeitpunkt der Blutentnahme

Patient	K	Krea	ASAT	ALAT	BSG	CRP	Gluc	Hb	Leuko	Thrombo	LDL
1, w.	4,3	0,68	8	11	5/13	<0,1	109	12,9	4,3	243	149
2, w.	3,6	0,74	8	8	13/28	<0,1	95	12,5	7,3	205	136
3, w.	3,9	0,71	6	9	8/14	<0,1	95	13,4	10,1	340	137
4, m.	3,7	0,75	7	12	8/17	<0,1	89	14,0	4,8	299	91
5, m.	4,2	0,76	10	16	7/25	0,2	108	15,2	4,8	262	120
6, m.	3,6	0,64	5	9	10/20	0,8	113	14,8	5,9	133	141
7, m.	4,3	0,68	10	21	8/13	0,3	89	14,8	9,9	189	87
8, w.	3,6	0,67	9	8	6/13	<0,1	95	12,8	4,9	289	114
9, w.	3,9	0,77	9	11	6/16	<0,1	101	14,7	6,0	234	108
10, m.	4,8	1,10	11	21	12/28	<0,1	115	14,0	5,7	174	153
11, w.	4,5	0,67	7	18	5/11	0,2	97	14,2	6,1	332	136
12, w.	4,1	0,67	8	10	14/24	0,4	104	13,0	4,9	191	106
13, m.	3,6	1,01	12	18	6/20	0,2	115	14,0	4,8	229	97
14, m.	3,9	0,80	7	9	8/14	<0,1	100	16,6	9,2	185	102
15, m.	3,9	0,67	12	23	6/9	<0,1	104	14,5	7,1	238	90
16, m.	3,6	1,03	7	9	6/12	0,1	83	14,2	5,5	281	146
17, w.	3,7	0,60	6	7	10/17	0,3	98	14,8	9,4	238	138
18, m.	3,6	0,85	9	15	14/26	0,3	115	14,6	4,8	167	145
19, m.	4,1	0,57	12	18	6/13	<0,1	112	15,2	4,8	191	156
20, w.	3,9	0,61	17	19	8/18	<0,1	83	14,5	7,6	340	116
21, m.	3,8	1,02	10	18	12/23	0,4	101	14,3	6,8	187	112
22, w.	4,3	0,63	9	13	14/29	0,1	112	13,7	7,6	201	138
23, m.	4,5	1,07	11	13	14/30	<0,1	77	14,5	4,8	163	141

24, m.	4,0	0,76	10	12	8/17	0,3	102	14,0	5,1	215	115
25, m.	4,2	0,76	11	13	3/10	0,1	101	14,0	6,5	227	86
26, m.	3,9	1,14	9	11	12/25	0,5	111	14,3	6,1	223	122
27, w.	4,3	0,80	7	13	6/10	0,8	67	13,2	9,2	328	146
28, m.	3,9	0,88	10	10	15/28	0,7	86	14,7	9,4	332	148
29, w.	4,0	0,70	8	9	7/12	<0,1	77	12,9	5,6	222	151
30, m.	4,1	0,92	8	18	13/29	0,7	96	14,6	7,2	256	159
31, m.	4,5	1,07	11	13	14/30	<0,1	77	14,5	4,8	163	105
32, w.	4,3	0,69	17	19	4/9	0,3	117	13,9	4,9	259	155
33, m.	4,2	0,84	5	7	15/30	0,3	89	14,5	5,8	196	90
34, m.	4,0	0,84	9	22	12/25	0,4	120	14,4	8,5	208	114
35, m.	4,5	0,85	10	17	6/14	<0,1	113	14,4	5,9	234	119
36, w.	4,6	0,61	13	16	14/30	<0,1	90	13,0	6,8	315	160
37, m.	4,5	0,85	10	17	6/14	<0,1	89	14,6	4,8	247	106
38, m.	4,4	0,74	11	17	8/18	<0,1	113	14,4	6,0	199	83
39, w.	3,9	0,78	6	8	12/23	0,3	76	12,9	4,8	310	90
40, w.	4,1	0,66	7	8	6/19	<0,1	67	13,1	6,2	244	77
41, w.	4,1	0,60	13	15	14/25	<0,1	90	13,5	5,3	167	98
42, m.	4,0	0,90	12	18	12/30	0,7	80	14,7	7,1	208	129
43, w.	3,8	0,66	15	20	14/27	0,6	112	13,7	5,3	312	154
44, m.	3,9	0,80	8	12	8/12	<0,1	77	14,0	4,9	174	100
45, w.	4,2	0,61	6	9	10/17	<0,1	89	13,5	8,1	155	88
46, m.	3,9	0,56	7	8	6/9	<0,1	96	14,5	5,3	176	67
47, w.	4,0	0,66	9	9	10/21	0,3	61	13,4	6,0	151	99
48, w.	4,0	0,78	12	14	8/10	0,2	78	13,9	4,9	201	115

49, m.	4,6	0,77	17	21	6/13	<0,1	90	14,6	7,6	340	143
50, w.	4,0	0,69	10	16	12/17	<0,1	78	12,5	5,6	227	151
51, m.	4,5	0,99	8	8	13/27	0,3	92	14,3	5,6	221	158
52, m.	3,7	0,86	8	13	10/20	0,2	97	15,8	7,8	188	123
53, w.	3,9	0,72	9	10	10/17	<0,1	70	13,7	5,9	178	80
54, w.	4,3	0,60	10	12	9/15	0,2	78	13,4	9,0	210	103
55, w.	4,2	0,76	12	17	12/29	<0,1	110	15,0	7,9	274	112
56, m.	3,6	0,90	13	20	15/30	0,5	92	16,4	9,0	256	139
57, m.	3,9	0,71	8	11	8/15	<0,1	70	17,5	6,7	211	142
58, w.	4,7	0,66	7	9	5/17	0,3	86	13,1	7,0	233	160
59, w.	4,2	0,98	13	14	13/26	<0,1	98	14,2	8,7	312	78
60, m.	4,4	0,82	7	10	10/20	<0,1	96	15,2	6,5	219	142
61, w.	3,9	0,62	12	10	7/12	0,2	103	14,1	6,6	254	128
62, m.	3,7	1,00	11	15	14/29	<0,1	83	16,2	5,6	281	80
63, w.	4,3	0,83	9	7	6/12	0,5	65	14,3	6,9	156	54
64, m.	3,6	0,79	14	18	14/30	<0,1	104	15,4	8,1	278	102
65, m.	3,9	0,99	17	15	10/15	0,2	78	16,0	7,2	276	125
66, w.	4,3	1,00	11	12	14/29	<0,1	70	14,3	5,1	188	141
67, m.	3,9	0,66	7	9	5/12	<0,1	98	15,2	7,4	303	110
68, w.	3,6	0,87	10	17	8/17	0,5	72	14,8	5,5	298	154
69, w.	4,2	0,71	18	22	9/14	<0,1	66	14,9	7,9	277	144
70, m.	4,7	0,69	15	16	12/19	0,2	75	15,9	6,5	249	90
71, m.	4,5	0,73	5	10	14/30	<0,1	65	14,9	5,0	196	101
72, m.	4,4	0,69	13	17	5/18	<0,1	81	15,2	8,6	177	68
73, w.	3,9	0,90	8	12	11/15	<0,1	99	14,6	6,0	271	133

74, m.	4,0	0,90	9	7	8/18	0,3	60	16,0	4,9	339	109
75, m.	4,3	0,79	18	22	12/17	<0,1	69	15,3	6,3	301	149
76, m.	4,0	0,92	15	17	10/21	0,4	109	14,8	5,4	231	155
77, w.	3,7	0,78	12	12	15/26	<0,1	100	14,0	6,1	255	104
78, w.	4,2	0,60	8	19	14/25	<0,1	70	14,9	4,8	239	133
79, w.	4,2	0,65	10	13	13/23	0,2	88	14,2	7,7	198	155
80, w.	4,1	0,78	12	15	6/13	<0,1	62	14,5	4,8	201	132
81, m.	3,9	0,60	7	10	5/11	<0,1	75	15,0	8,0	317	113

w. – weiblich, m. – männlich, K – Kalium (mmol/l), Krea – Kreatinin (mg/dl), ASAT/ALAT (U/l), BSG – Blutsenkungsgeschwindigkeit, CRP – C-reaktives Protein (mg/dl), Gluc– Glukose im Plasma (mg/dl), Hb – Hämoglobin (g/dl), Leuko – Leukozyten (/nl), Thrombo – Thrombozyten (/nl), LDL – low density lipoprotein (mg/dl).

Die arterielle Gefäßwand stellt sich im Ultraschallbild dreischichtig dar. Direkt an das Lumen angrenzend findet sich eine echoreiche Zone, die Intima. Die folgende echoarme Schicht entspricht der Media, welche an eine breite echoreiche Zone, die Adventitia, grenzt (Abb. 5).

Die Intima-Media-Dicke der A. carotis communis wurde nach der “leading edge” - Methode gemessen (Gamble G., 1993; Frost D., 1998). Dabei erfolgte die Messung an der schallkopffernen Wand von der echoreichen Grenzfläche Lumen/Intima bis zur Grenzfläche Media/Adventitia.

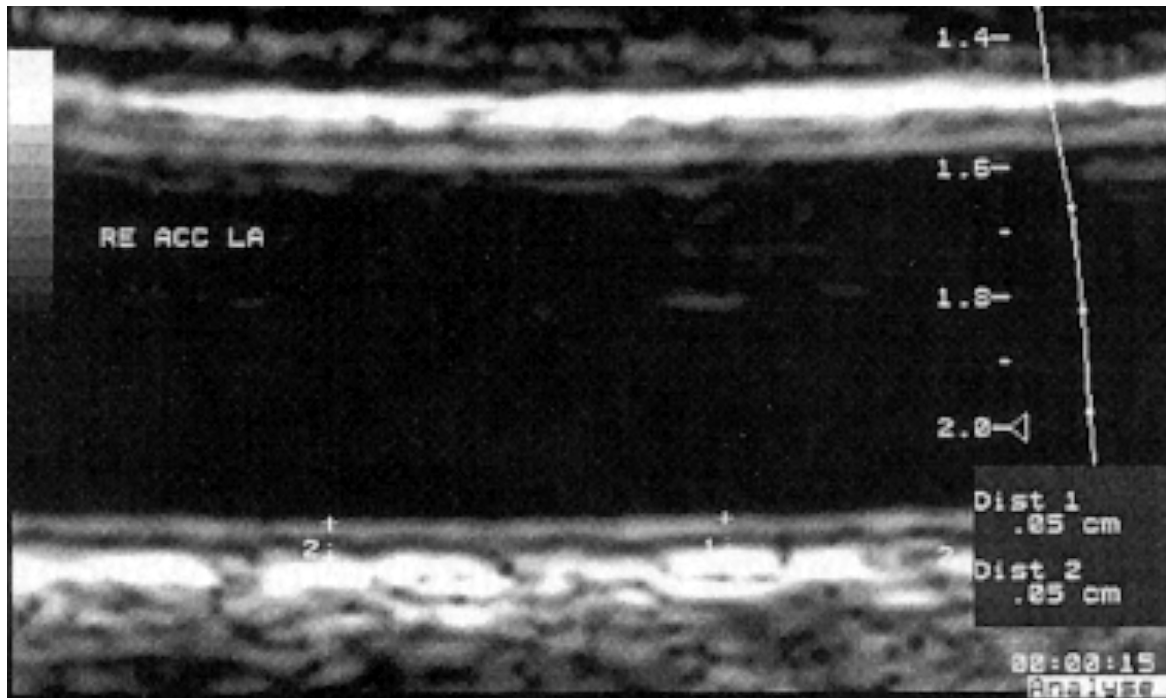


Abb. 5: Sonographie der A. carotis communis. Bestimmung der Intima-Media-Dicke nach der “leading edge” – Methode mit einem 7-10 MHz Schallkopf (HDI, ATL Gerät).

Tabelle 3: Patientendaten einschließlich der Intima-Media-Dicke der A. carotis communis nach der “leading edge” - Methode

Patient	Alter	Gewicht kg	Intima-Media-Dicke (mm)
1	21	76,5	0,5
2	50	55,5	0,6
3	57	66,0	0,7
4	23	78,4	0,4
5	56	71,6	0,6
6	58	83,2	0,7
7	58	69,9	0,6
8	60	74,3	0,6

9	54	68,7	0,6
10	55	80,2	0,5
11	52	89,2	0,6
12	28	78,7	0,6
13	36	87,8	0,6
14	64	63,5	0,7
15	53	56,9	0,6
16	61	74,2	0,7
17	43	80,1	0,6
18	57	66,7	0,6
19	49	88,1	0,7
20	47	54,0	0,5
21	56	87,8	0,5
22	35	96,0	0,5
23	63	66,7	0,6
24	32	63,3	0,4
25	51	76,0	0,7
26	68	91,9	0,7
27	38	87,5	0,5
28	62	78,9	0,6
29	42	80,7	0,7
30	27	76,6	0,6
31	63	78,5	0,7
32	39	81,2	0,6
33	41	55,8	0,7

34	47	62,8	0,6
35	60	69,0	0,6
36	60	89,3	0,7
37	32	77,8	0,6
38	23	65,8	0,5
39	37	54,9	0,6
40	49	65,4	0,6
41	52	70,7	0,6
42	31	87,9	0,7
43	43	90,2	0,7
44	56	74,4	0,6
45	50	76,9	0,6
46	19	63,2	0,4
47	28	89,9	0,5
48	45	78,5	0,7
49	63	79,5	0,7
50	48	70,9	0,6
51	48	89,6	0,7
52	53	81,2	0,6
53	39	69,0	0,5
54	59	75,0	0,5
55	43	75,1	0,6
56	51	78,8	0,6
57	53	86,9	0,6
58	32	95,6	0,7

59	43	76,5	0,6
60	55	81,0	0,6
61	45	69,8	0,6
62	46	77,7	0,6
63	28	75,5	0,5
64	47	83,9	0,6
65	45	78,0	0,6
66	52	71,5	0,6
67	57	82,2	0,5
68	58	89,0	0,7
69	63	79,9	0,6
70	41	76,4	0,6
71	40	66,5	0,6
72	44	69,0	0,6
73	54	87,0	0,7
74	57	80,7	0,6
75	38	85,8	0,6
76	54	89,0	0,7
77	54	79,6	0,6
78	45	77,2	0,6
79	63	81,5	0,6
80	56	85,6	0,6
81	49	80,0	0,7

6.10. Expression von Daten

Alle Resultate werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) dargestellt. Das Symbol n bezeichnet die Zahl der Experimente. Alle Bestimmungen im ELISA wurden in Duplikaten oder Triplikaten ausgeführt. Falls nicht anders gekennzeichnet, wurden alle Experimente mindestens dreifach durchgeführt. Die statistische Signifikanz von unterschiedlichen Ergebnissen wurde mittels des Student-T-Test untersucht, falls die Werte einer Normalverteilung nach dem Kolmogorov-Smirnov goodness-of-fit-Test folgten. Bei nicht normal verteilten Messwerten wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. P-Werte von $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Die Korrelationen wurden berechnet nach Spearman oder Pearson R. Die gesamte Statistik wurde mittels Statistical Package (SPSS) 9, 1999 (Chicago, USA), erstellt.

7. Ergebnisse

7.1. Immunologische Aktivierung von isolierten peripheren Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie

7.1.1. Sekretion pro-entzündlicher Zytokine

Von großer Wichtigkeit ist die funktionelle Charakterisierung der peripheren Monozyten von Hypertonikern hinsichtlich der freigesetzten pro-entzündlichen Zytokine. Diese stehen am Anfang des immunologischen Ablaufes einer Entzündungsreaktion und könnten damit von größerer Bedeutung sein als die Aktivierung von Monozyten im späteren Verlauf einer solchen Reaktion.

Zu den durch Monozyten freigesetzten pro-entzündlichen Zytokinen gehören Interleukin-1 β , Tumor Nekrose Faktor- α und Interleukin-6. Als Kontrolle wurden Zellen von gesunden Probanden gewonnen und getrennt kultiviert.

In Vorversuchen wurden mit Monozyten gesunder Kontrollen für jedes pro-entzündliche Zytokin Konzentrations- und Zeitkinetiken durchgeführt, mit deren Hilfe die optimalen Stimulationsbedingungen ermittelt werden konnten.

7.1.1.1. Interleukin-1 β

Angiotensin II wurde beispielsweise in Konzentrationen von 10^{-6} bis 10^{-10} mol/l zur Bestimmung der optimalen Stimulationskonzentration peripherer Monozyten eingesetzt. Dabei zeigte sich eine erste Stimulation der IL-1 β Sekretion ab Angiotensin II Konzentrationen von 10^{-10} mol/l (Abb. 6), wobei die IL-1 β Sekretion bei Konzentrationen von 10^{-9} bis 10^{-6} mol/l nahezu gleich blieb. Daher setzten wir Angiotensin II in einer Konzentration von 10^{-8} mol/l zur Stimulation der Zellen ein.

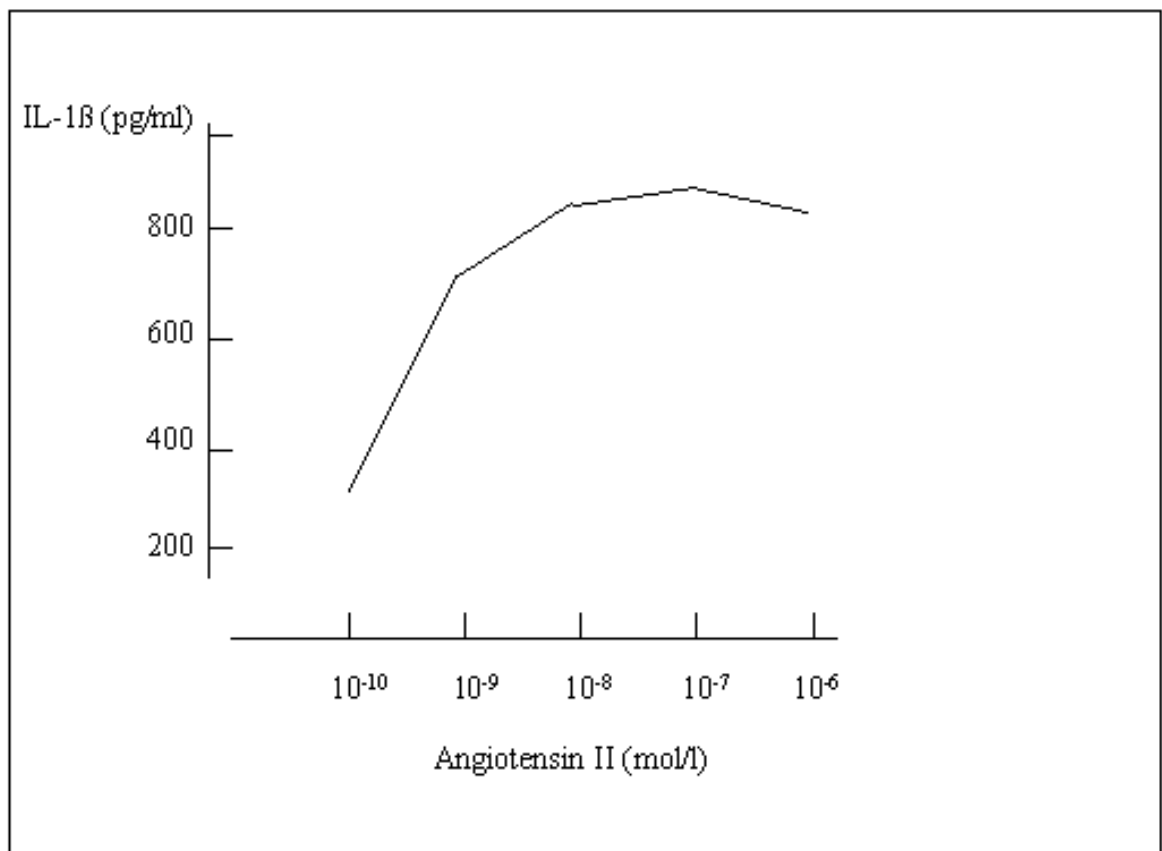


Abb. 6: Konzentrationskinetik für Angiotensin II. Sekretion von IL-1 β durch periphere Monozyten in Abhängigkeit von der Angiotensin II Konzentration. (n = 7, SD < 10 %)

LPS stimulierte die IL-1 β Sekretion peripherer Monozyten in wesentlich stärkerem Ausmaß als Angiotensin II (Abb. 7). Aufgrund der Toxizität der Substanz sowie der bereits erheblichen Stimulation bei niedriger Konzentration verwendeten wir in den folgenden Versuchen 10 ng/ml LPS.

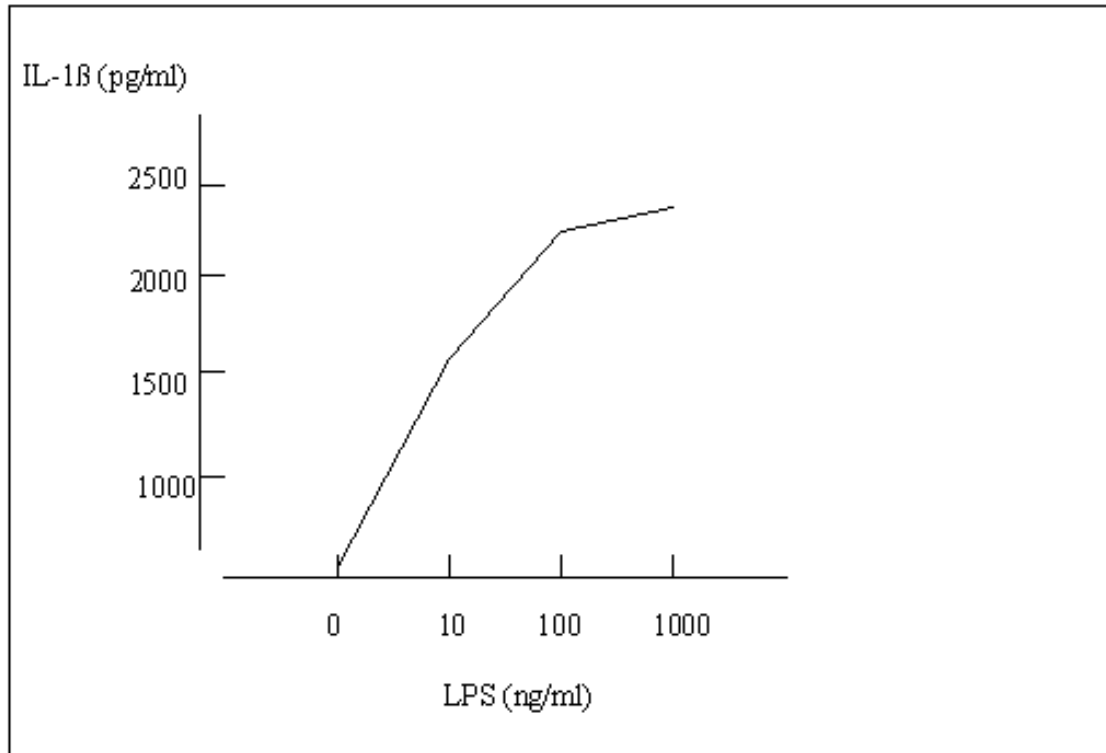


Abb. 7: Konzentrationskinetik für LPS. Sekretion von IL-1 β durch periphere Monozyten in Abhängigkeit von der LPS Konzentration (n = 5, SD < 10 %).

LPS führte zu einer messbaren Stimulation der IL-1 β Sekretion nach 4-6 Stunden (Abb. 8). Nach 20-24 Stunden erreichte die IL-1 β Sekretion in den Zellüberstand ein Plateau. Aufgrund der Zeitkinetiken für LPS wurde eine Stimulationszeit von ca. 20 Stunden eingesetzt.

In weiteren Vorversuchen wurden neben der Zeitkinetik für Angiotensin II auch Konzentrations- und Zeitkinetiken wie oben dargestellt für TNF- α und IL-6 durchgeführt, die ähnliche Ergebnisse ergaben und so die Stimulationsbedingungen nicht veränderten.

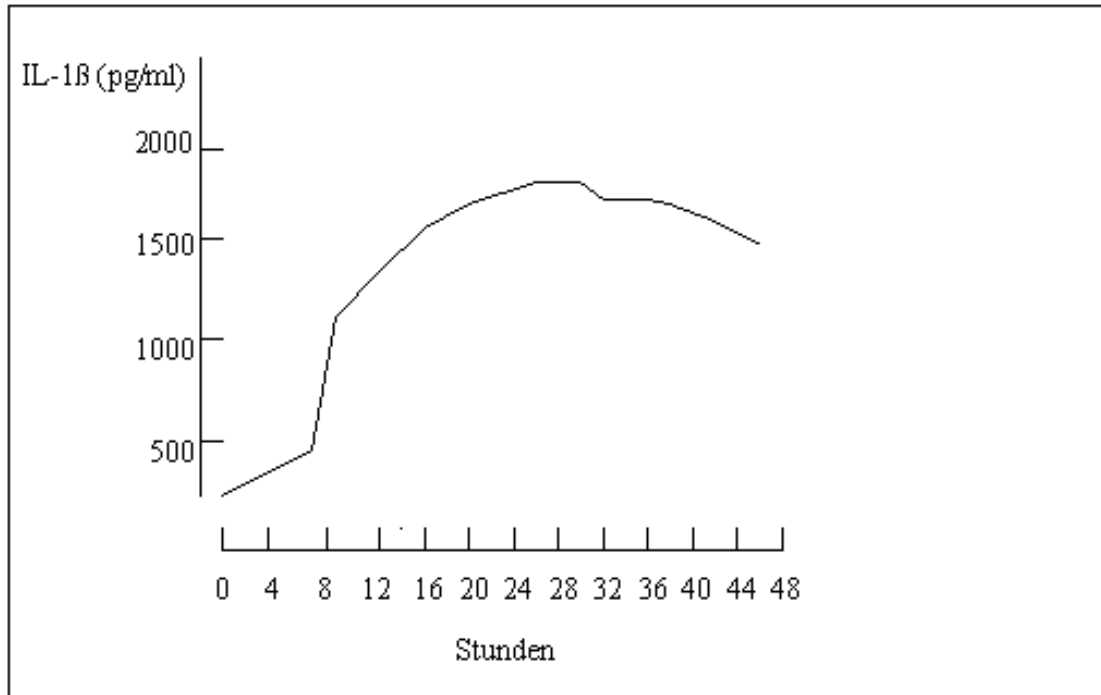


Abb. 8: Zeitkinetik für LPS. Sekretion von IL-1 β peripherer Monozyten in Abhängigkeit von der Dauer der Stimulation mit 10 ng/ml LPS. (n = 3, SD < 10 %)

Es war eine deutliche IL-1 β Spontansekretion durch isolierte Monozyten von Hypertonikern in vitro zu beobachten. Die IL-1 β Sekretion von Patienten mit essentieller Hypertonie wies im Vergleich zu der Sekretion gesunder Probanden allerdings keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 9).

Da die Monozyten nur eine geringe Spontansekretion von IL-1 β zeigten, wurde mit Angiotensin II und LPS stimuliert. Nach Stimulation mit Angiotensin II (10^{-8} mol/l) bzw. LPS (10 ng/ml) für 20 Stunden fand sich bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine gegenüber den Kontrollen ohne Krankheitsbefund signifikant höhere Sekretion von IL-1 β ($P < 0,05$)(Abb. 10).

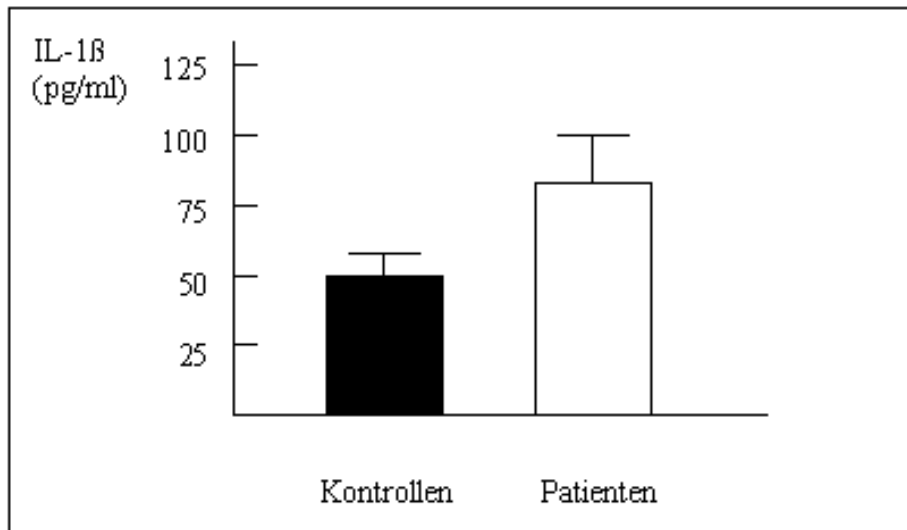


Abb. 9: Spontansekretion von IL-1 β der Monozyten von Patienten (n = 22) und Kontrollen (n = 24) nach 20 Stunden Zellkultur im Überstand.

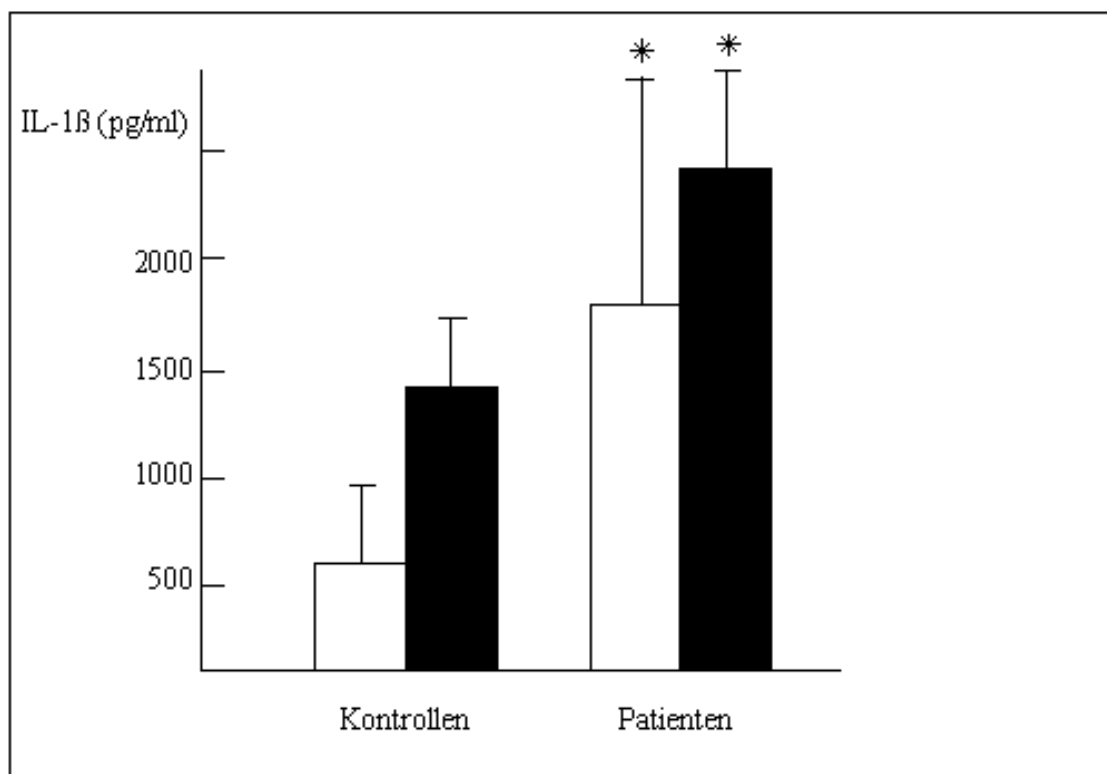


Abb. 10: IL-1 β Sekretion peripherer Monozyten von Patienten (n = 31) und Kontrollen (n = 35) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (□) oder LPS (■). (* = P < 0,05)

Interessanterweise war nach Vorinkubation der Monozyten mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan (10^{-8} mol/l) vor Angiotensin II Stimulation kein signifikanter Unterschied der IL-1 β Sekretion von Patienten und Kontrollen mehr nachweisbar (Abb. 11).

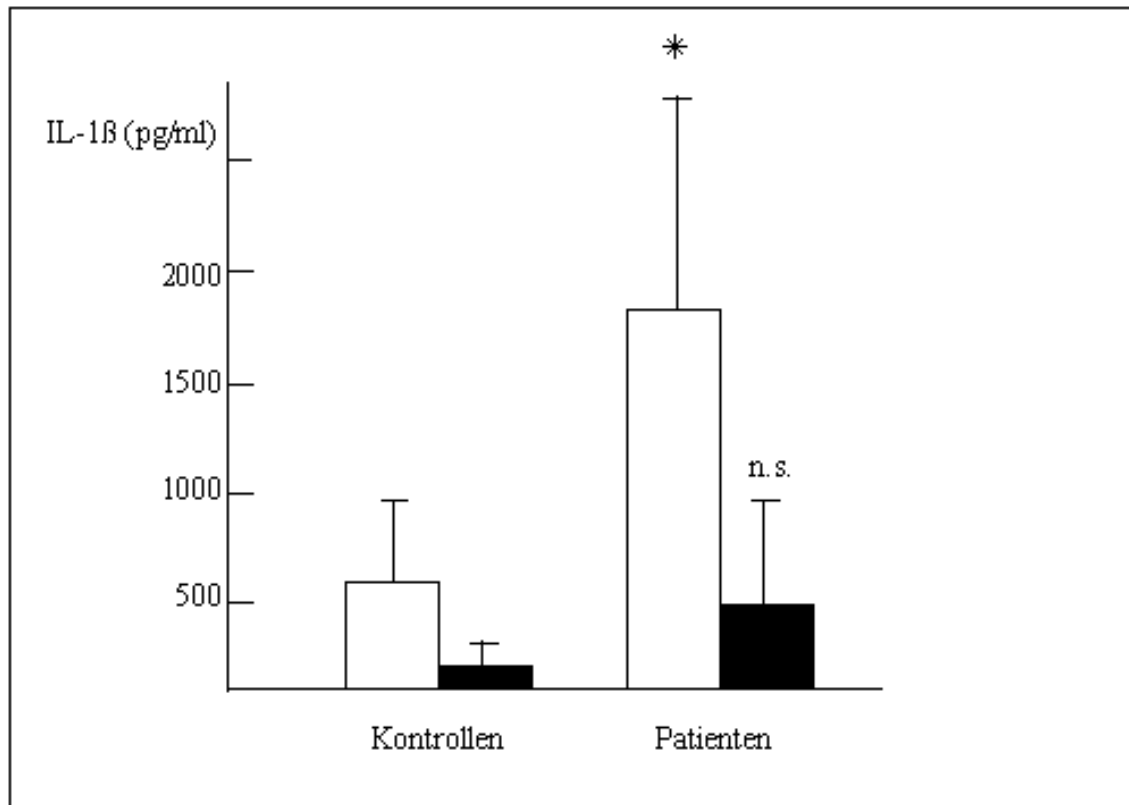


Abb. 11: IL-1 β Sekretion der Monozyten von Patienten (n = 31) und Kontrollen (n = 35) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (□) und 30 minütiger Vorinkubation mit Losartan (■). (* = $P < 0,05$; n.s. = nicht signifikant)

7.1.1.2. Tumor Nekrose Faktor- α

Ähnliche Resultate wie für IL-1 β fanden sich bei der Bestimmung der TNF- α Spontansekretion durch Monozyten, eine Sekretion des Zytokins war in nicht

nennenswertem Umfang zu beobachten. Vor allem war kein Unterschied zwischen Patienten (113 ± 16 pg/ml, $n = 22$) und Kontrollen (104 ± 12 pg/ml, $n = 24$) nachweisbar. Die TNF- α Sekretion der Monozyten ließ sich mit Angiotensin II stimulieren. Es fand sich eine tendenziell höhere Sekretion der Patientenmonozyten, die nicht signifikant war (Abb. 12). Nach Stimulation mit LPS (das für isolierte Monozyten wirksamste Stimulans) fand sich bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine gegenüber den Kontrollen ohne Krankheitsbefund signifikant erhöhte Sekretion von TNF- α (Abb. 12).

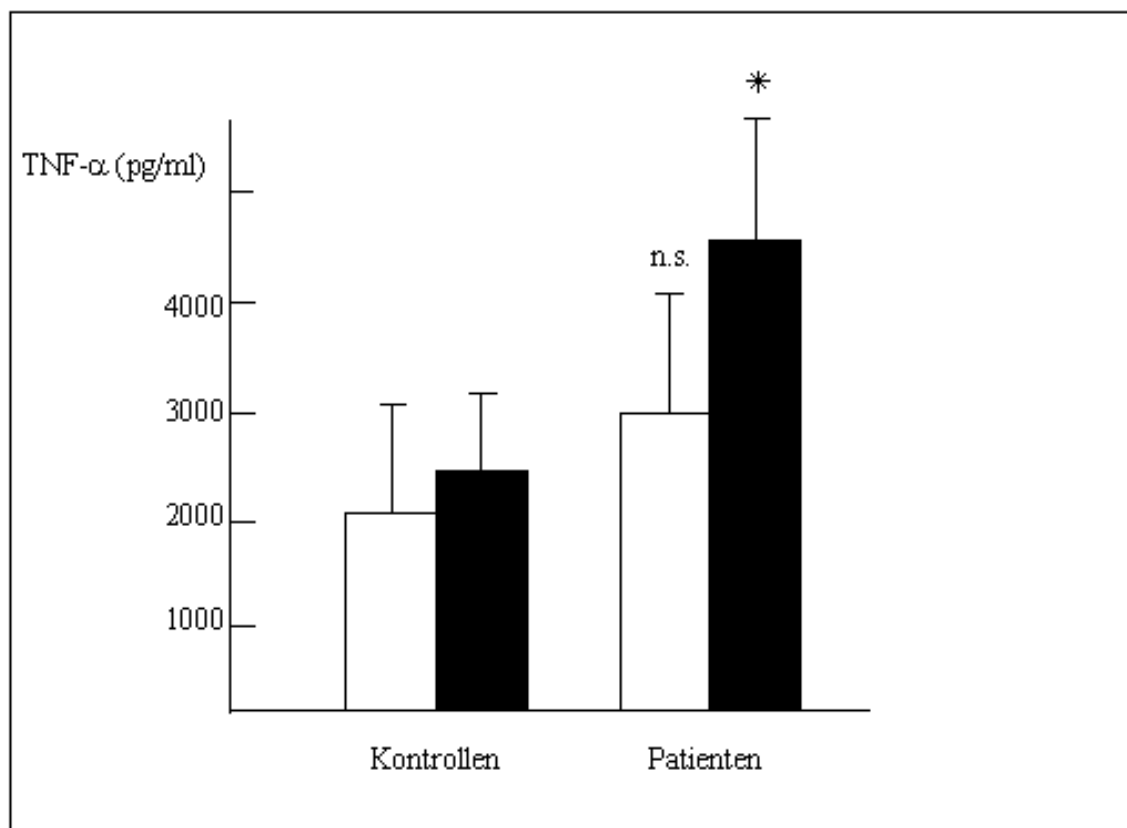


Abb. 12: TNF- α Sekretion der Monozyten von Patienten ($n = 31$) und Kontrollen ($n = 32$) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (□) oder LPS (■). (* = $P < 0,02$; n.s. = nicht signifikant)

7.1.1.3. Interleukin-6

Interleukin 6 wird ebenso zur Gruppe der pro-entzündlichen Zytokine gerechnet, obwohl seine biologischen Wirkungen sich von denen des TNF- α und IL-1 β unterscheiden. Monozyten tragen zur Sekretion von IL-6 in erheblichem Maße bei. Periphere Monozyten von Patienten und Kontrollen folgten in ihrem Spontansekretionsverhalten für IL-6 dem TNF- α : es ließ sich einerseits nur eine geringe Spontansekretion nachweisen. Andererseits bestand kein Unterschied zwischen Patienten (68 ± 8 pg/ml, $n = 22$) und Kontrollen (63 ± 11 pg/ml, $n = 24$).

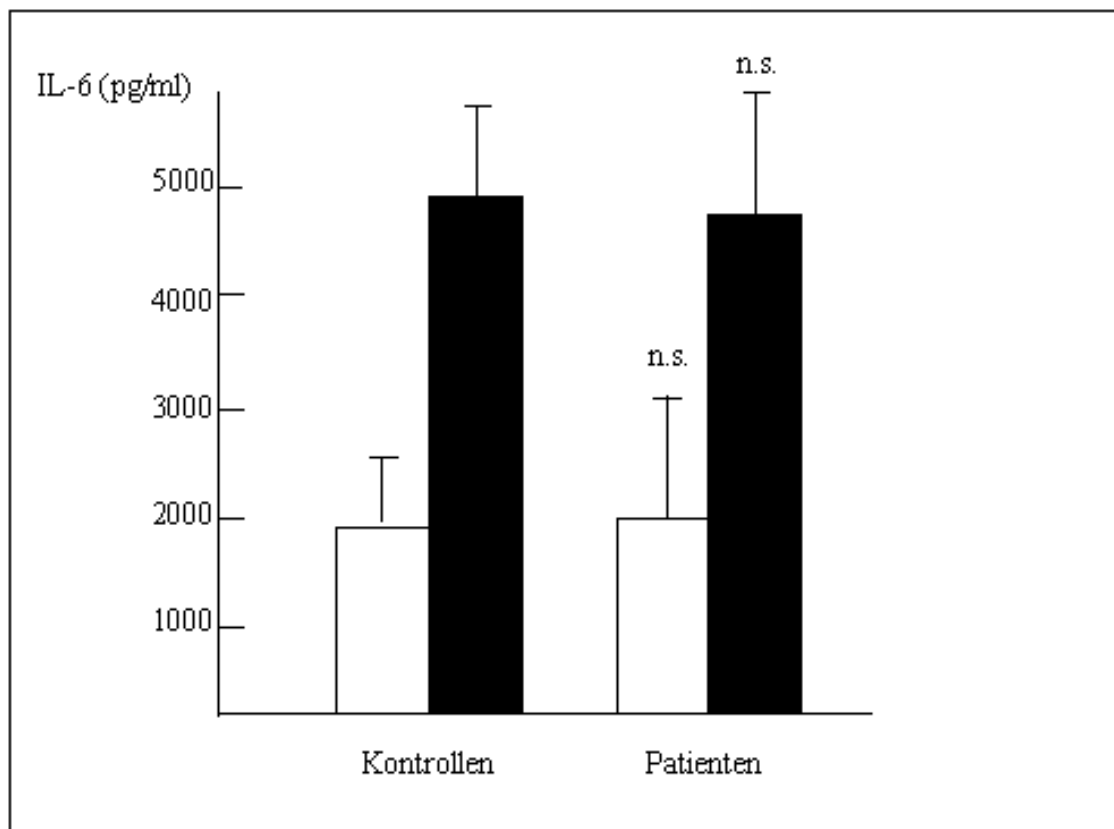


Abb. 13: Sekretion von IL-6 der Monozyten von Patienten ($n = 31$) und Kontrollen ($n = 35$) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (\square) oder LPS (\blacksquare). (n.s. = nicht signifikant)

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie sowie den Normalkontrollen war eine deutlich erhöhte Angiotensin II- sowie LPS-induzierte Sekretion der Monozyten zu verzeichnen. Es bestanden allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen (Abb. 13).

Zusammenfassend fand sich im Vergleich mit den Normalkontrollen eine vermehrte in vitro Sekretion pro-entzündlicher Zytokine (mit Ausnahme des IL-6) durch Monozyten aus dem peripheren Blut von Hypertoniepatienten nach Stimulation. Diese Befunde weisen daraufhin, dass scheinbar eine vermehrte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine (z.B. bei erhöhten Angiotensin II Spiegel) einer eigentlichen entzündlichen Reaktion beispielsweise der Gefäßwand vorausgeht und damit möglicherweise ein pathophysiologisch bedeutsames Ereignis darstellt.

Die in den Experimenten verwendeten Monozyten-Präparationen wurden fortlaufend durch Flusszytometrie hinsichtlich ihrer Zusammensetzung kontrolliert (s. 6.2.2.).

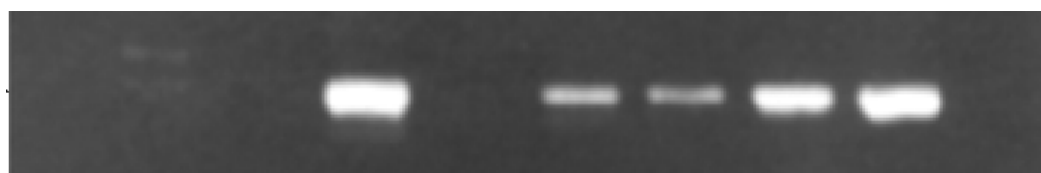
7.1.2. Bestimmung der mRNA pro-entzündlicher Zytokine

Die Regulation der pro-entzündlichen Zytokine ist außerordentlich komplex, sie findet sowohl prä- als auch post-transkriptional statt. In den nachfolgenden Untersuchungen stand daher die Frage im Mittelpunkt, ob der vermehrten Produktion von IL-1 β und TNF- α durch die Monozyten essentieller Hypertoniker ursächlich eine transkriptionale Hochregulation zugrunde liegt. Eine semiquantitative Polymerasekettenreaktion zum Nachweis von TNF- α und IL-1 β wurde zu diesem Zweck aufgebaut. Diese PCR benutzte als internen Standard ein RNA Konstrukt, das die Upstream- und Downstream-Primer-Bindungsstellen für IL-1 β bzw. TNF- α enthielt und das parallel zum Wild-Typ IL-1 β /TNF- α amplifiziert wurde. Das Amplifikationsprodukt des Konstrukts war vom PCR

Produkt der Zytokin mRNA durch sein unterschiedliches Molekulargewicht differenzierbar. Der Nachweis des synthetisierten PCR Produkts erfolgte mit einem DNA Sequenzierautomaten (Applied Biosystems), der das an das 5'-Ende des Primers gekoppelte Fluoresceinmolekül über einen Argon Laser anregte. Die gescannten Rohdaten wurden mit dem Programm "gene scan"® (Applied Biosystems) analysiert. Die Abschätzung der enthaltenen authentischen RNA Konzentration erfolgte in der Probe, in der Konzentrationen der PCR Produkte von synthetischem Standard und authentischer RNA am ehesten äquimolar waren.

7.1.2.1. IL-1 β mRNA Konzentration

Isolierte Monozyten von Normalkontrollen und Hypertoniepatienten wurden für 4 Stunden mit Angiotensin II (10^{-8} mol/l) oder LPS (10 ng/ml) stimuliert. Die RNA wurde extrahiert und eine semiquantitative RT-PCR zur Bestimmung der IL-1 β mRNA Konzentrationen eingesetzt (Abb. 14). Die IL-1 β mRNA der Patienten war nach Stimulation mit Angiotensin II (10^{-8} mol/l) oder LPS (10 ng/ml) gegenüber der der Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 15).



MWM 1 2 Kontrollen Patienten

Abb. 14: PCR Produkte für eine Amplifikation mit spezifischen IL-1 β Primern. MWM = Marker verschiedenen Molekulargewichts, 1 = Positivkontrolle, 2 = Negativkontrolle, Kontrollen = PCR Produkte nach Verwendung von Monozyten zweier Normalkontrollen

nach Stimulation mit Angiotensin II, Patienten = PCR Produkte nach Verwendung von Monozyten zweier Patienten nach Stimulation mit Angiotensin II, die Banden zeigen die PCR Produkte der in den Proben enthaltenen Wild-Typ mRNA

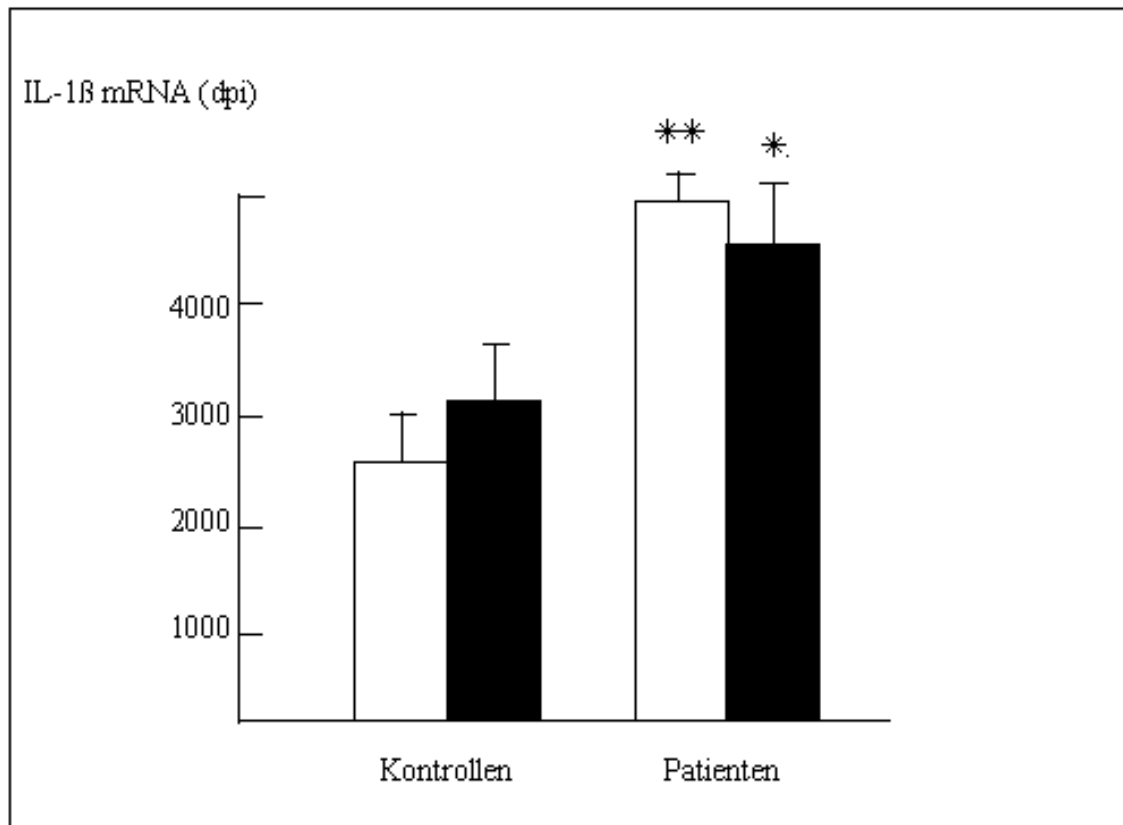


Abb. 15: IL-1β mRNA peripherer Monozyten von Kontrollen (n = 14) und Patienten (n = 12) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (□) oder LPS (■). (** = P < 0,02; * = P < 0,05)

7.1.2.2. TNF-α mRNA Konzentration

Nach LPS Stimulation fand sich eine signifikant höhere TNF-α mRNA bei den Patientenmonozyten im Vergleich zu den Kontrollen. Parallel zu den Ergebnissen auf Proteinebene ließ sich auch auf mRNA-Ebene nach Angiotensin II Stimulation kein

Unterschied der TNF- α Amplifikationsprodukte zwischen Patienten und Kontrollen nachweisen (Abb. 16).

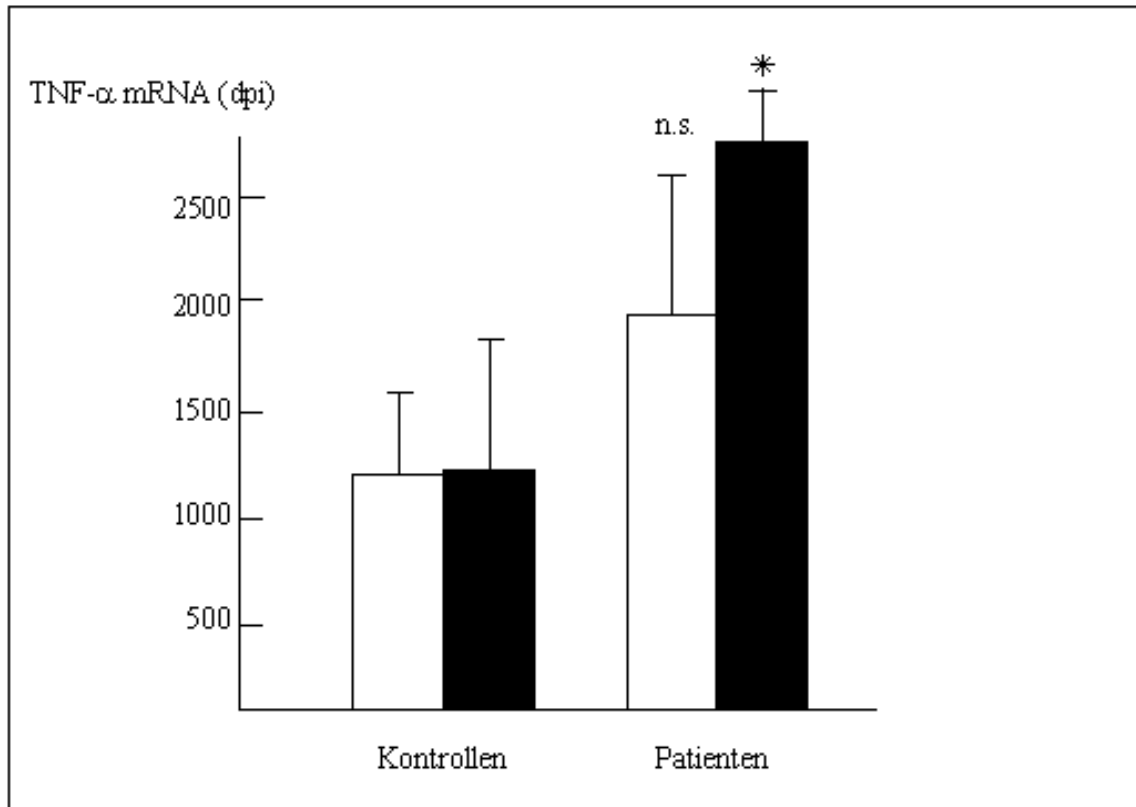


Abb. 16: TNF- α mRNA peripherer Monozyten von Kontrollen (n = 14) und Patienten (n = 12) im Vergleich nach Stimulation mit Angiotensin II (□) oder LPS (■). (n.s. = nicht signifikant; * = P < 0,05)

Anhand der vorliegenden Untersuchungen bestätigte sich, dass auch auf mRNA Ebene eine dem Sekretionsverhalten der Monozyten vergleichbare Voraktivierung zu finden ist.

Die Frage schien uns wichtig, ob es sich hier um ein Phänomen handelt, das lediglich die Sekretion und Transkription pro-entzündlicher Zytokine durch Monozyten von Hypertoniepatienten betrifft, oder ob weitere, anders regulierte Funktionen dieser Zellen betroffen sind. Es wurde daher die Kapazität peripherer Monozyten zur Sekretion von Sauerstoffsuperoxid mittels Chemilumineszenz untersucht.

7.1.3. Superoxidproduktion

Es ist bereits aus früheren Untersuchungen bekannt, dass bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen die aktivierten Leukozyten vermehrt Superoxidanionen freisetzen (Kitahora T., 1988; Vachier I., 1992; Bruce I., 1997). In den durchgeführten Experimenten unterschied sich allerdings die Chemilumineszenzaktivität der unstimulierten Monozyten nicht signifikant zwischen Hochdruckpatienten ($20,0 \pm 29,7$ mV/ 10^5 Zellen) und gesunden Probanden ($15,4 \pm 6,3$ mV/ 10^5 Zellen, $P = 0,94$; Abb. 17).

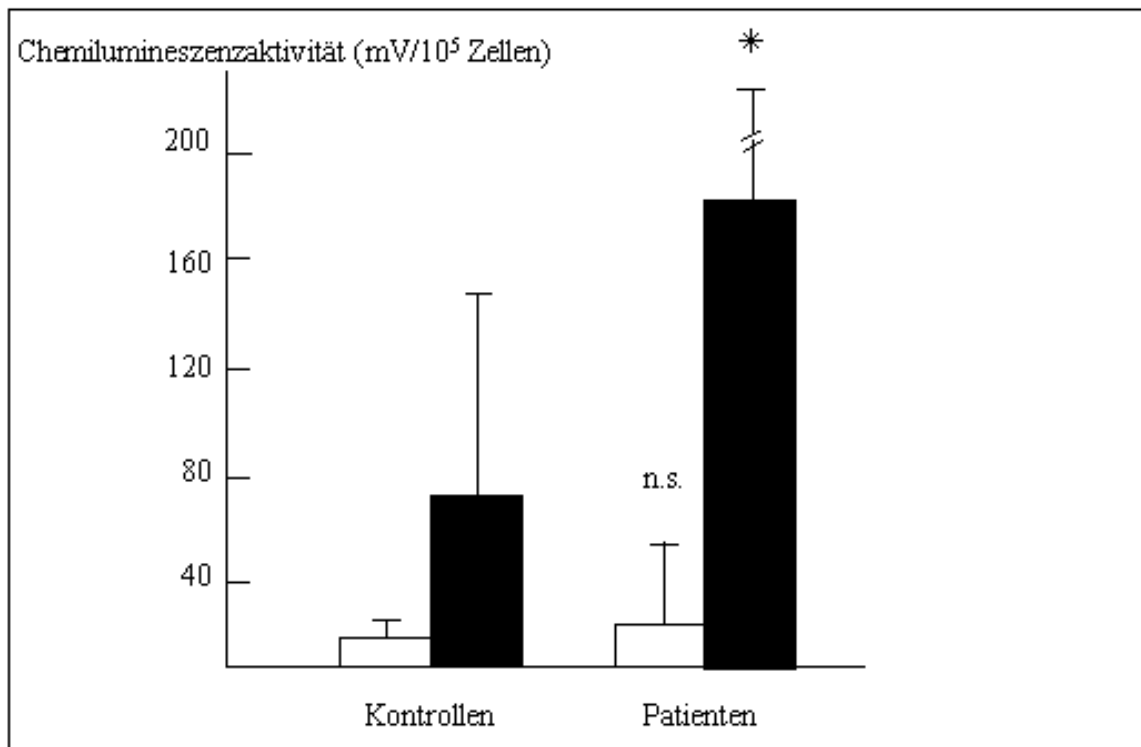


Abb. 17: Maximale Chemilumineszenzaktivität der Monozyten von Hochdruckpatienten und Kontrollen im Vergleich. Unstimuliert (□) fand sich kein signifikanter Unterschied (n.s.). Nach Stimulation mit Angiotensin II (■) fand sich ein signifikanter Unterschied (* = $P < 0,002$, $n = 20$).

Die Monozyten hypertensiver Patienten wiesen signifikant höhere Chemilumineszenzaktivitäten nach Stimulation mit Angiotensin II auf als die Kontrollgruppe (Patienten: 172 ± 189 , Kontrollen: $73,8 \pm 67,5$ mV/ 10^5 Zellen, $P = 0,002$, Abb. 17).

Nach Stimulation mit PMA war die maximale Chemilumineszenzaktivität (peak values) der Monozyten hypertensiver Patienten ($702,5 \pm 845,6$ mV/ 10^5 Zellen) signifikant erhöht im Vergleich zu den Kontrollen ($228,4 \pm 504$ mV/ 10^5 Zellen, Abb. 18). Wurden die peripheren Monozyten mit PMA und LPS inkubiert, ließ sich kein signifikanter Unterschied der Chemilumineszenzaktivität von Patienten und Normalkontrollen nachweisen (Abb. 18).

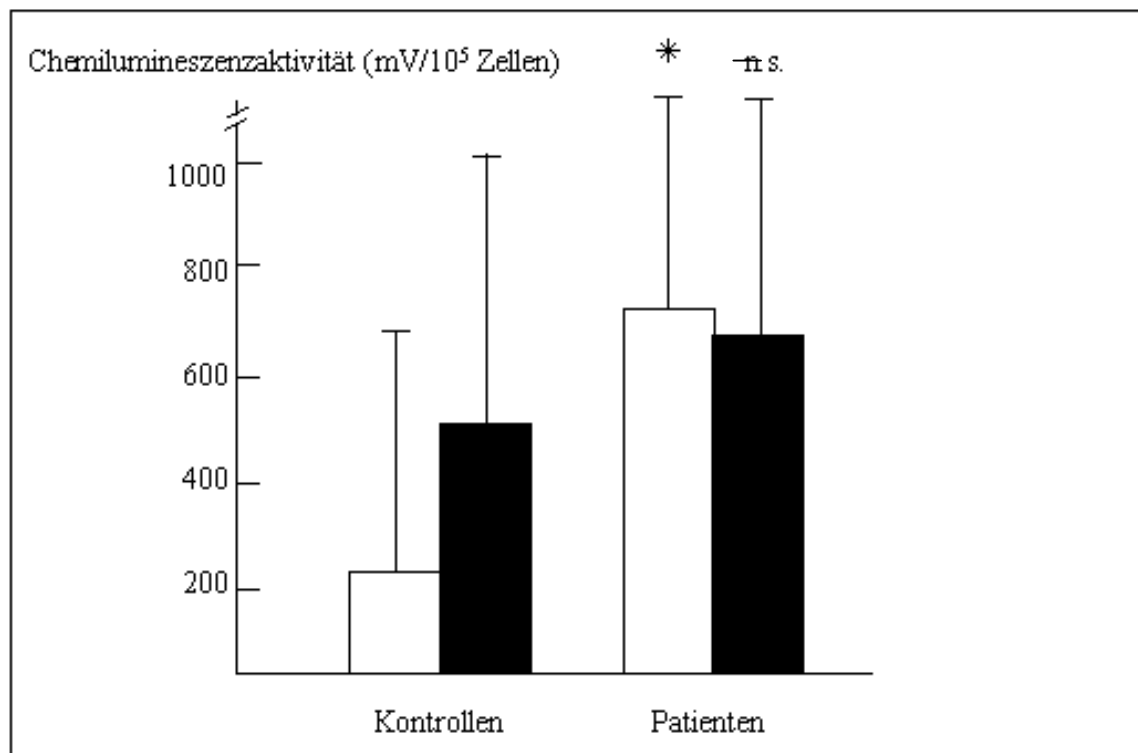


Abb. 18: Maximale Chemilumineszenzaktivität der Monozyten von Hochdruckpatienten und Kontrollen im Vergleich nach Stimulation mit PMA (8×10^{-5} M, \square) oder PMA und LPS (10 ng/ml, \blacksquare). (n.s. = nicht signifikant; * = $P < 0,005$, $n = 20$)

Diese Befunde sind als deutliche Hinweise auf eine Störung der Monozytenfunktion bei Hypertonikern zu werten, da neben der Transkription und Sekretion pro-entzündlicher Zytokine auch ein anders reguliertes System wie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetaboliten betroffen ist.

Die Chemilumineszenzaktivität postkonfluenter HUVEC betrug dagegen lediglich $6,2 \pm 3,2 \text{ mV}/10^5 \text{ Zellen}$ und stieg nach Stimulation mit Angiotensin II nicht signifikant auf $10,7 \pm 2,2 \text{ mV}/10^5 \text{ Zellen}$ an.

7.1.4. Adhäsionsmoleküle

7.1.4.1. Serumkonzentration zirkulierender Adhäsionsmoleküle

Die Serumspiegel von sICAM-1 (Patienten: $223,2 \pm 87,6$; Kontrollen: $192,1 \pm 47,8 \text{ ng/ml}$, $P = 0,04$) und sVCAM-1 (Patienten: $669,4 \pm 331,6$; Kontrollen: $572,5 \pm 194,4 \text{ ng/ml}$, $P = 0,01$) waren bei Hochdruckpatienten im Vergleich zu Normalkontrollen signifikant erhöht. Die Konzentrationen von sE-Selektin für Patienten ($54,1 \pm 27,4 \text{ ng/ml}$) und Kontrollen ($49,8 \pm 25,6 \text{ ng/ml}$, $P = 0,3$) wiesen keinen signifikanten Unterschied auf.

7.1.4.2. Aktivierungsabhängige Oberflächenmoleküle auf den Monozyten

Um den Aktivitätszustand peripherer Monozyten besser zu definieren, wurden isolierte mononukleäre Zellen mit Mehrfachmarkierung (Drei-Farben Immunfluoreszenz) am Durchflusszytometer charakterisiert. Dabei wurden sowohl während der Aktivierung typischerweise exprimierte Antigene wie CD54 oder CD11b untersucht, als auch die Expression von Molekülen, die die Identifikation (CD14) erlaubte. So wurden die

Monozyten nach typischem Fluoreszenzmuster durch forward- und sideward-scatter Parameter (R1) erkannt und ausgewertet (Abb. 19). Zusätzlich wurden nur CD14 positive Ereignisse (R2) in dem APC-Fluoreszenzhistogramm als Monozyten gewertet. Es wurden jeweils mindestens 10.000 Ereignisse gemessen. Im RPE- und FITC-Fluoreszenzhistogramm wurden die Monozyten (R1 und R2 = G3) als positiv gewertet, die eine Fluoreszenzintensität deutlich oberhalb der eines Isotyp-Kontrollantikörpers (RPE-konjugierter monoklonaler Maus IgG1, κ ; FITC-konjugierter monoklonaler Maus IgG2, BD) hatten (M1).

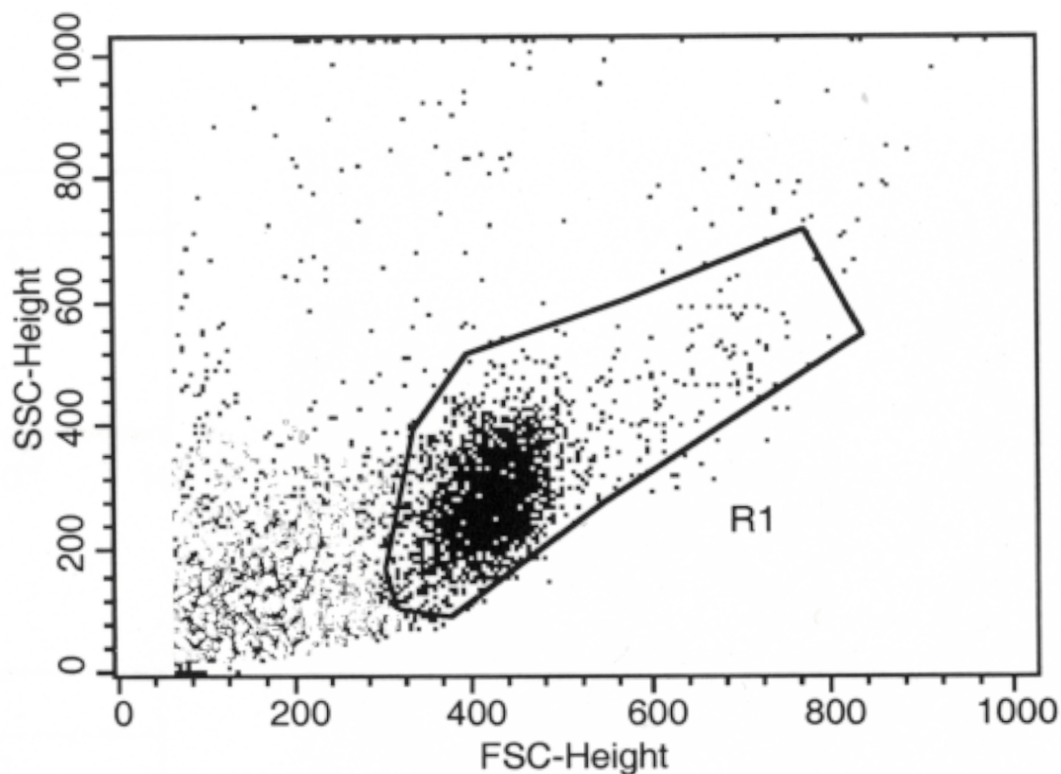


Abb. 19: FACS peripherer Monozyten (R1) nach typischem Fluoreszenzmuster im forward- (FSC, Maßstab für die Zellgröße) und sideward-height-scatter (SSC, Maßstab für die Granularität). Die Abbildung zeigt die FACS-Ergebnisse von Monozyten eines repräsentativen Hypertoniepatienten. Es wurden jeweils 100 000 Zellen ausgewertet.

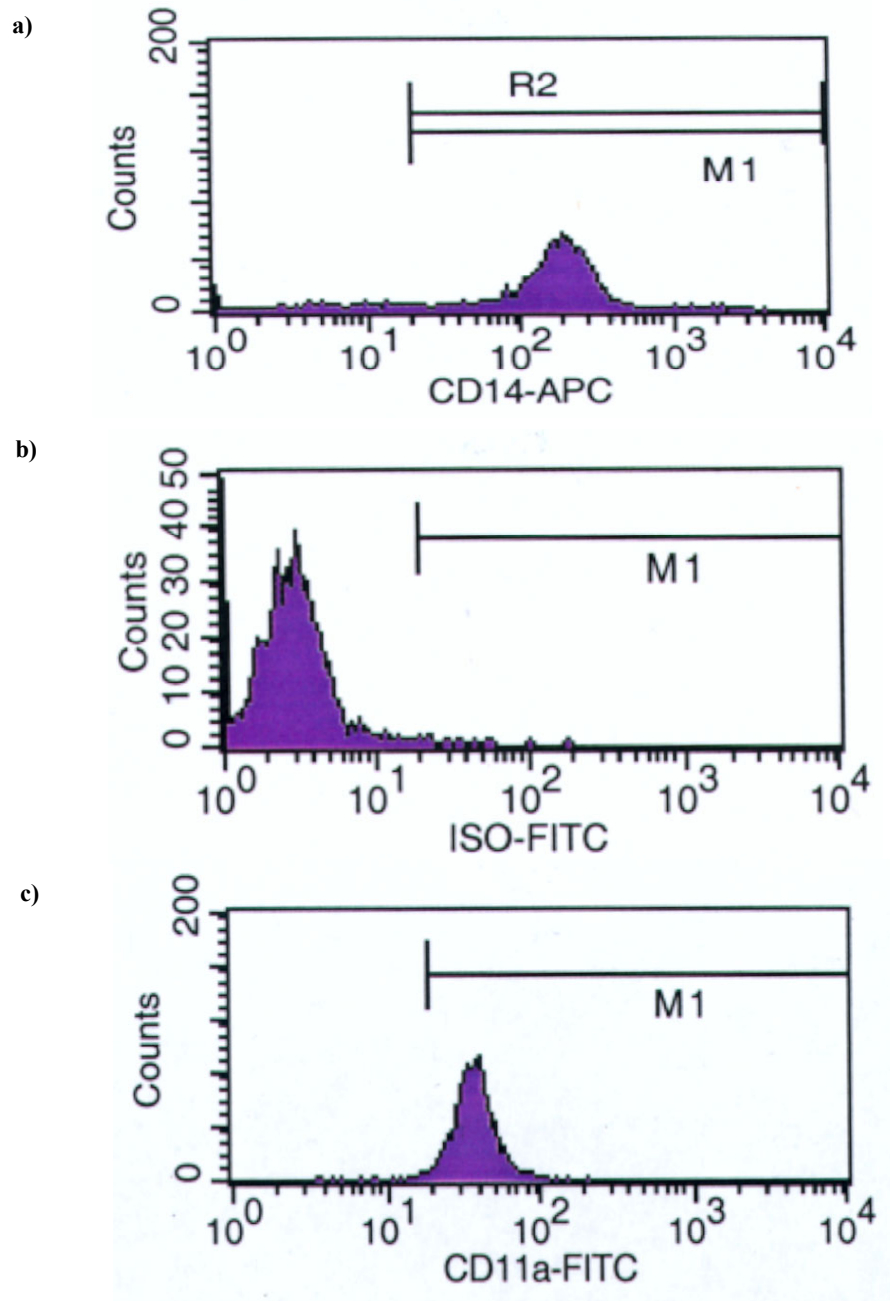


Abb. 20: FACS Analyse peripherer Monozyten des repräsentativen Hypertoniepatienten (Abb. 18). Jeweils 10 000 Ereignisse wurden gemessen (Counts = Ereignisse). **20a:** Färbung mit einem APC-markierten CD14 Antikörper. Nur CD14 positive Ereignisse wurden als Monozyten gewertet (R2). **20b:** Färbungen mit einem FITC-markierten Isotyp-Antikörper gegen IgG. Im Fluoreszenzhistogramm wurden nur die Monozyten als positiv gewertet, die eine Fluoreszenzintensität oberhalb des Isotyp-Kontrollantikörpers hatten (M1). **20c:** Nachweis von CD11a mittels FITC konjugiertem Antikörper, einem bei aktivierten Monzyten typischerweise exprimiertem Antigen.

Für die Monozyten von Hochdruckpatienten fanden sich in der Regel höhere Fluoreszenzintensitäten (counts) der Kanäle aktivierungsabhängiger Oberflächenmoleküle im Vergleich zu den Normalkontrollen. Eine signifikant erhöhte Expression der aktivierungsabhängigen Oberflächenmoleküle fand sich auf den Patientenmonozyten für sämtliche mit ICAM-1 in Beziehung stehenden Oberflächenmarker (CD54, CD11a - Liganden u.a. ICAM-1, ICAM-2; CD11b – Ligand u.a. ICAM-1, LPS, Abb. 21). Eine Ausnahme bildete lediglich CD29 (Patienten: $78,1 \pm 35,6$; Kontrollen: $116,6 \pm 73,0$ counts, $P = 0,27$). Die mittlere Fluoreszenzintensität eines Kanals ist ein Maß für die Antikörperbindung und somit für die Antigen-Oberflächenexpression.

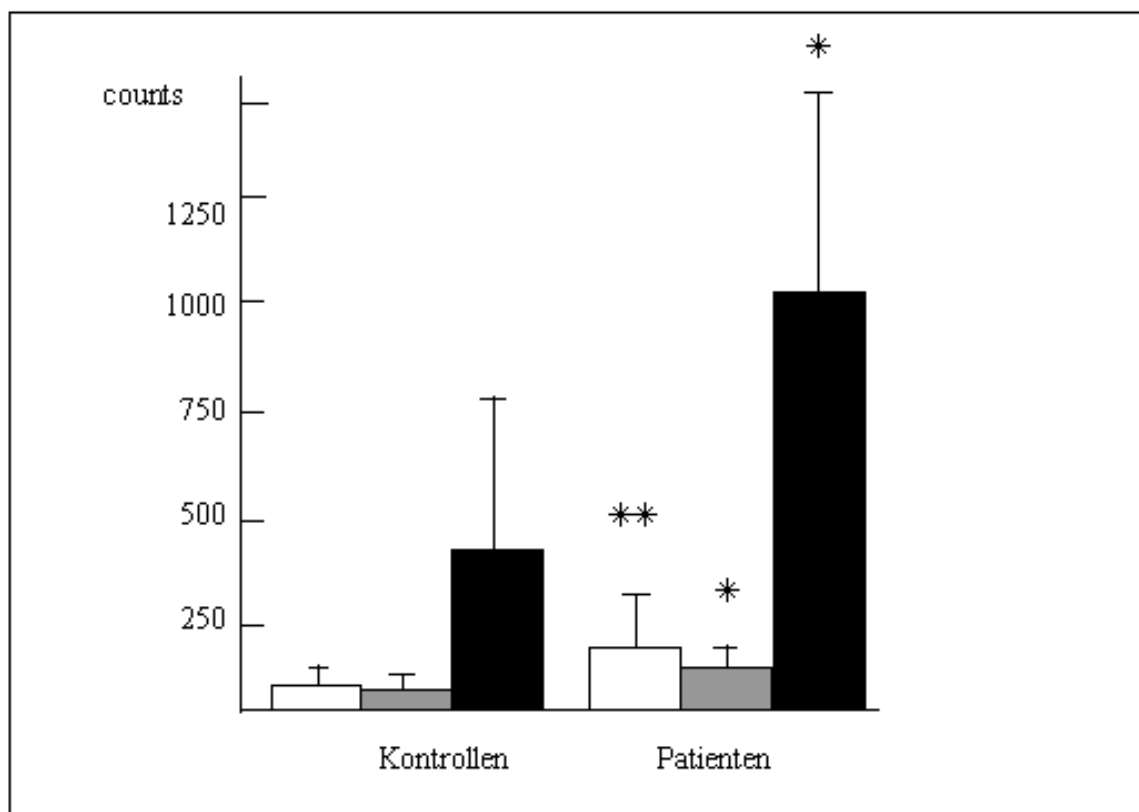


Abb. 21: Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenmarker CD54 (□), CD11a (▒) und CD11b (■) auf Patienten- und Kontrollmonozyten im Vergleich. (* = $P = 0,025$; ** = $P = 0,004$; $n = 40$)

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen für CD31 (Patienten: $117,9 \pm 91,8$; Kontrollen: $91,7 \pm 81,5$ counts, $P = 0,51$), CD 44 (Patienten: $306,2 \pm 288,0$; Kontrollen: $286,0 \pm 151,0$ counts, $P = 0,68$) und CD49 (Patienten: $164,0 \pm 171,5$; Kontrollen: $108 \pm 113,9$ counts, $P = 0,14$).

7.2. Adhäsionsassays

7.2.1. Unstimulierte Adhäsion

Um eine mögliche pathophysiologische Bedeutung der Monozytenfunktionsstörung von Hypertoniepatienten zu ermitteln, führten wir Adhäsionsversuche an humane Umbilikalvenenendothelzellen durch. Dabei wurde die Aktivierung peripherer Monozyten durch Messung der Adhäsion an HUVEC als Prozentsatz der initial eingesetzten Zellen ermittelt.

Bereits die spontane Adhäsion von Monozyten hypertensiver Patienten an HUVEC Monolayer war im Vergleich zu der Adhäsion der Monozyten von Normalkontrollen signifikant erhöht (Patienten: $41,7 \pm 9,7$; Kontrollen: $22,3 \pm 7,5$ %, $P = 0,017$, Abb. 22).

7.2.2. Adhäsion nach Stimulation

7.2.2.1. LPS

Da LPS als Monozytenstimulans etabliert ist, interessierte uns besonders der in vitro Einfluss dieser Substanz auf die Adhäsion isolierter Monozyten von Hochdruckpatienten und gesunden Probanden. Diese experimentelle Serie (Patienten = 37, Kontrollen = 41) zeigte, dass LPS ein sehr potentes Adhäsionsstimulans für normale als auch Patientenmonozyten ist, so dass aufgrund der massiven Monozytenaktivierung kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Adhäsion mehr nachweisbar war (Abb. 22).

Die Adhäsion nach LPS Stimulation war dementsprechend bei Normalkontrollen und Patientenmonozyten im Vergleich zur Spontanadhäsion derselben (s.o.) signifikant erhöht (Patienten: $76,8 \pm 28,5$ %, $P = 0,005$; Kontrollen: $72,9 \pm 8,1$ %, $P < 0,0005$).

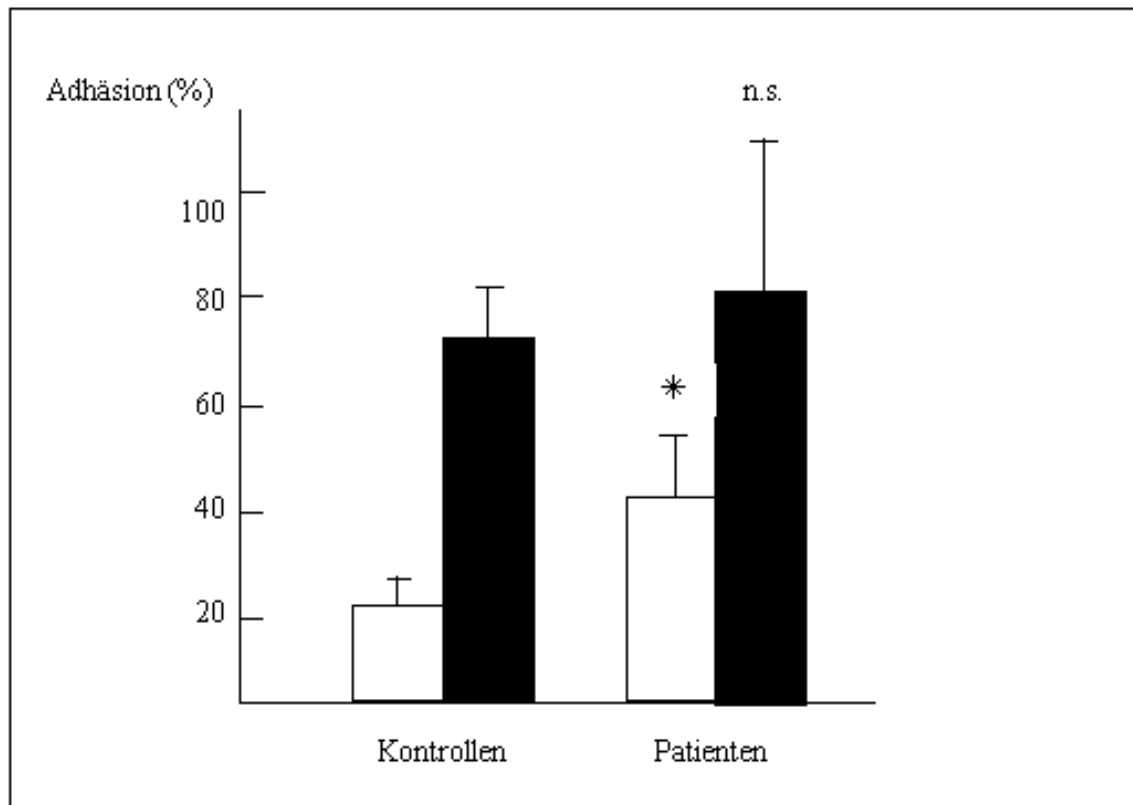


Abb. 22: Adhäsion von Patientenmonozyten ($n = 37$) und Kontrollen ($n = 41$) an humane Umbilikalvenenendothelzellen im Vergleich in Prozent der eingesetzten Monozyten: spontan (□) sowie nach Stimulation mit LPS (10 ng/ml, ■). (* = $P = 0,017$; n.s. = nicht signifikant).

7.2.2.2. Angiotensin II

Um den Einfluss eines physiologisch vorkommenden Stimulans auf die in vitro Adhäsion peripherer Monozyten an HUVEC zu untersuchen, setzten wir Angiotensin II ein. In Vorversuchen hatten wir die optimale Konzentration des Mediators zur Monozyten-

stimulation mit 10^{-8} mol/l ermittelt. Angiotensin II führte zum Anstieg der Adhäsion bei Patienten- ($48,7 \pm 15,2$ %, $P = 0,1$) und Kontrollmonozyten ($30,6 \pm 14,0$ %, $P = 0,06$), welcher allerdings im Vergleich mit der jeweiligen Spontanadhäsion nicht signifikant war.

Auch nach Angiotensin II Stimulation war der Unterschied der Adhäsion zwischen Patienten- und Probandenmonozyten an HUVEC hochsignifikant ($P = 0,01$, Abb. 23). Diese Experimente wiesen daraufhin, dass den bei einem Teil der Hypertoniker erhöhten Angiotensin II Serumspiegeln möglicherweise eine negative Bedeutung beikommt.

7.2.2.3. Eprosartan

Mit dem in vitro Einsatz des AT1-Rezeptorantagonisten Eprosartan, untersuchten wir, ob die Angiotensin II Wirkung auf die Monozytenadhäsion blockierbar ist. Dazu erfolgte die Inkubation der Monozyten mit Eprosartan (10^{-6} mol/l) für 30 min vor Stimulation mit Angiotensin II.

Eprosartan führte zur Reduzierung der Monozytenadhäsion an HUVEC bei Patienten ($42,0 \pm 12,8$ %) und Kontrollen ($25,6 \pm 11,2$ %) auf Werte, welche annähernd der Spontanadhäsion entsprachen (Abb. 23). Dabei fiel die Reduktion der Adhäsion der Patientenmonozyten an HUVEC vergleichsweise deutlicher aus.

Diese Befunde passen zu der auf Zytokinebene nachgewiesenen, Losartan-induzierten Reduktion der Angiotensin II stimulierten Sekretion pro-entzündlicher Zytokine.

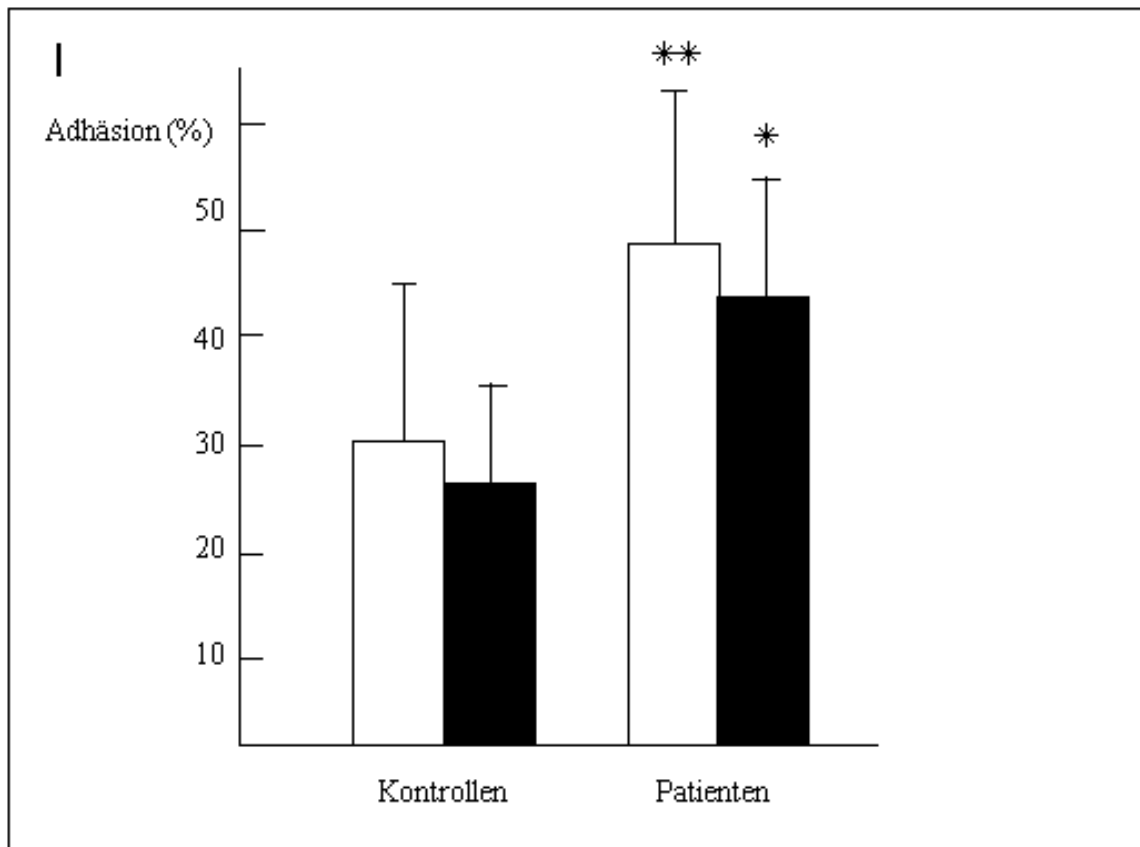


Abb. 23: Adhäsion von Patientenmonozyten (n = 37) und Kontrollen (n = 41) an humane Umbilikalvenenendothelzellen im Vergleich in Prozent der eingesetzten Monozyten: nach Angiotensin II Stimulation (□) sowie nach zusätzlicher Vorinkubation mit Eprosartan (■). (** = P = 0,01; * = P < 0,05).

7.3. Korrelationen

Um den Einfluss von Blutdruck, Alter und Geschlecht auf die erhaltenen Zytokin-konzentrationen sowie Adhäsionswerte zu evaluieren, wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Dabei korrelierte in keinem Fall das Geschlecht der Patienten und Probanden mit den ermittelten Werten.

7.3.1. Zytokinkonzentration und Blutdruck

Korrelationsanalysen wurden für IL-1 β , TNF- α und IL-6 nach Stimulation mit Angiotensin II bzw. LPS und systolischem sowie diastolischem Blutdruck durchgeführt. Es ließen sich keine signifikanten Korrelationen von IL-1 β und TNF- α nach LPS Stimulation der Monozyten mit dem Blutdruck der Patienten bzw. Probanden nachweisen. Für IL-6 ließ sich weder nach Angiotensin II noch nach LPS Stimulation eine signifikante Korrelation mit dem Blutdruck nachweisen.

Nach Angiotensin II Stimulation der Patientenmonozyten ließ sich für IL-1 β nach Spearman eine leicht positive Korrelation lediglich mit dem systolischen Blutdruck nachweisen (Spearman: $r = 0,37$, $P = 0,04$; Pearson R: $r = 0,20$, $P = 0,27$, Abb. 24).

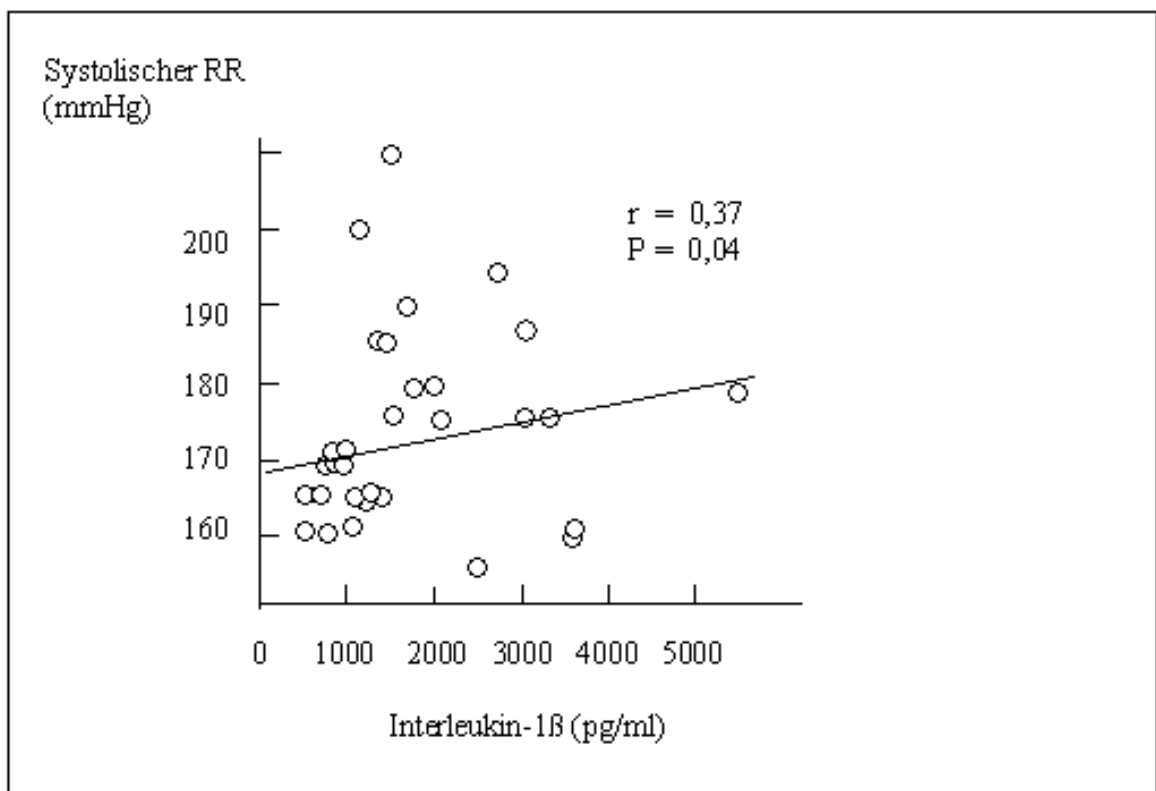


Abb. 24: Korrelation nach Spearman von IL-1 β nach Angiotensin II Stimulation der Patientenmonozyten mit dem systolischen Blutdruck ($n = 31$).

Ähnliche Ergebnisse wie für IL-1 β fanden sich für TNF- α (TNF- α - systolischer RR: Spearman: $r = 0,34$, $P = 0,06$; Pearson R: $r = 0,37$, $P = 0,04$).

Mit dem diastolischen Blutdruck der Patienten (Spearman: $r = 0,06$, $P = 0,75$; Pearson R: $r = -0,32$, $P = 0,86$) sowie den Monozyten der Normalkontrollen (IL-1 β – systolischer RR: Spearman: $r = 0,23$, $P = 0,18$; Pearson R: $r = 0,22$, $P = 0,20$) ließen sich keine statistisch nachweisbaren Zusammenhänge ermitteln.

7.3.2. Zytokinkonzentration und Alter

Die Konzentrationen der pro-entzündlichen Zytokine nach LPS und Angiotensin II Stimulation der Monozyten wurden mit dem Alter der Probanden (Mittelwert: 49 ± 13 Jahre) korreliert. Dabei konnte unabhängig von dem Stimulans kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden.

So betrug beispielsweise der Korrelationskoeffizient r nach Spearman $0,10$ ($P = 0,44$) für die Korrelation des Probandenalters mit IL-1 β nach Angiotensin II Stimulation ($n = 66$; Pearson R: $r = 0,06$, $P = 0,60$, Abb. 25).

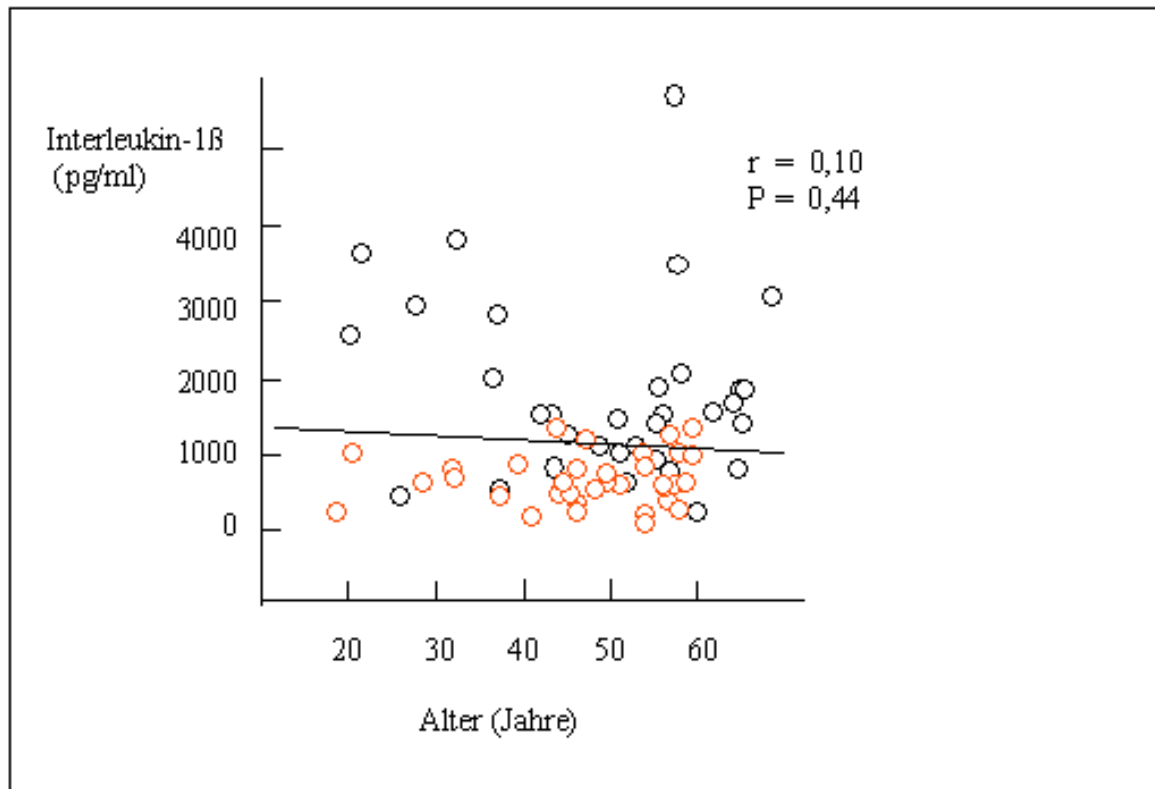


Abb. 25: Korrelation nach Spearman des Alters der Hochdruckpatienten (O, n = 31) und der Normalkontrollen (O, n = 35) mit IL-1 β nach Angiotensin II Stimulation der peripheren Monozyten in vitro.

7.3.3. Adhäsion und Blutdruck

Interessanterweise ergaben sich bei der Korrelation des systolischen wie des diastolischen Blutdruckes der Patienten (n = 37) mit der Spontanadhäsion der Monozyten an humane Umbilikalvenenendothelzellen in vitro keine statistisch signifikanten Zusammenhänge. Die Korrelationskoeffizienten nach Spearman ($r = 0,10$, $P = 0,57$) waren für den systolischen (Abb. 26) sowie den diastolischen Blutdruck identisch (systolischer RR – Spontanadhäsion: Pearson R: $r = 0,24$, $P = 0,16$; diastolischer RR – Spontanadhäsion: Pearson R: $r = 0,27$, $P = 0,11$).

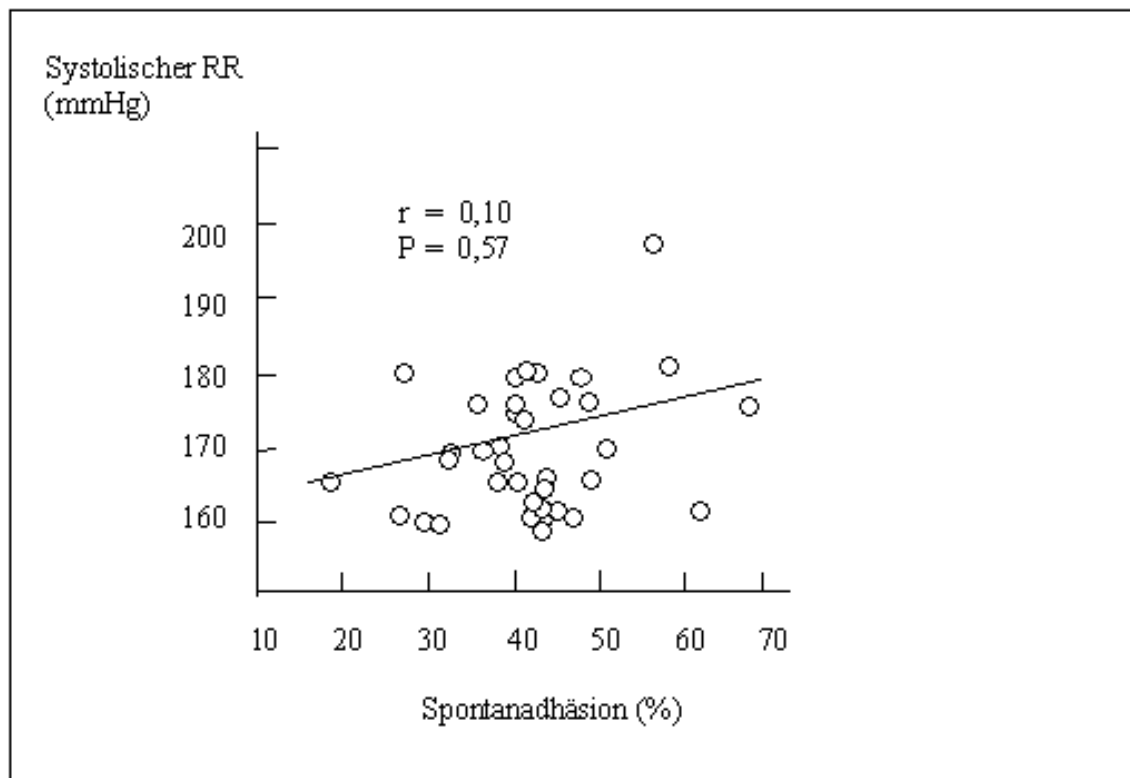


Abb. 26: Korrelation nach Spearman des systolischen Blutdruckes der Patienten (n = 37) mit der Spontanadhäsion der Monozyten an humane Umbilikalvenenendothelzellen.

7.3.4. Adhäsion und Alter

Analysen des Zusammenhanges der Spontanadhäsion peripherer Monozyten an HUVEC mit dem Alter der Probanden (n = 78) ergaben eine leicht positive Korrelation nach Pearson R ($r = 0,23$, $P = 0,04$; Spearman: $r = 0,21$, $P = 0,07$, Abb. 27). Der Mittelwert für das Alter der Probanden betrug $46,4 \pm 10,7$ Jahre.

Wurden lediglich das Alter der Kontrollen (n = 37) mit der Spontanadhäsion ihrer Monozyten an HUVEC korreliert, ergab sich ein hohes Signifikanzniveau (Pearson R: $r = 0,60$, $P < 0,0001$; Spearman: $r = 0,44$, $P = 0,004$). Interessanterweise ließ sich für die Adhäsion der Patientenmonozyten (n = 41) keine positive Korrelation mit dem Alter nachweisen (Pearson R: $r = -0,10$, $P = 0,56$; Spearman: $r = -0,24$, $P = 0,16$). Hier spielen scheinbar andere Mechanismen eine wichtigere Rolle als das Alter der Patienten.

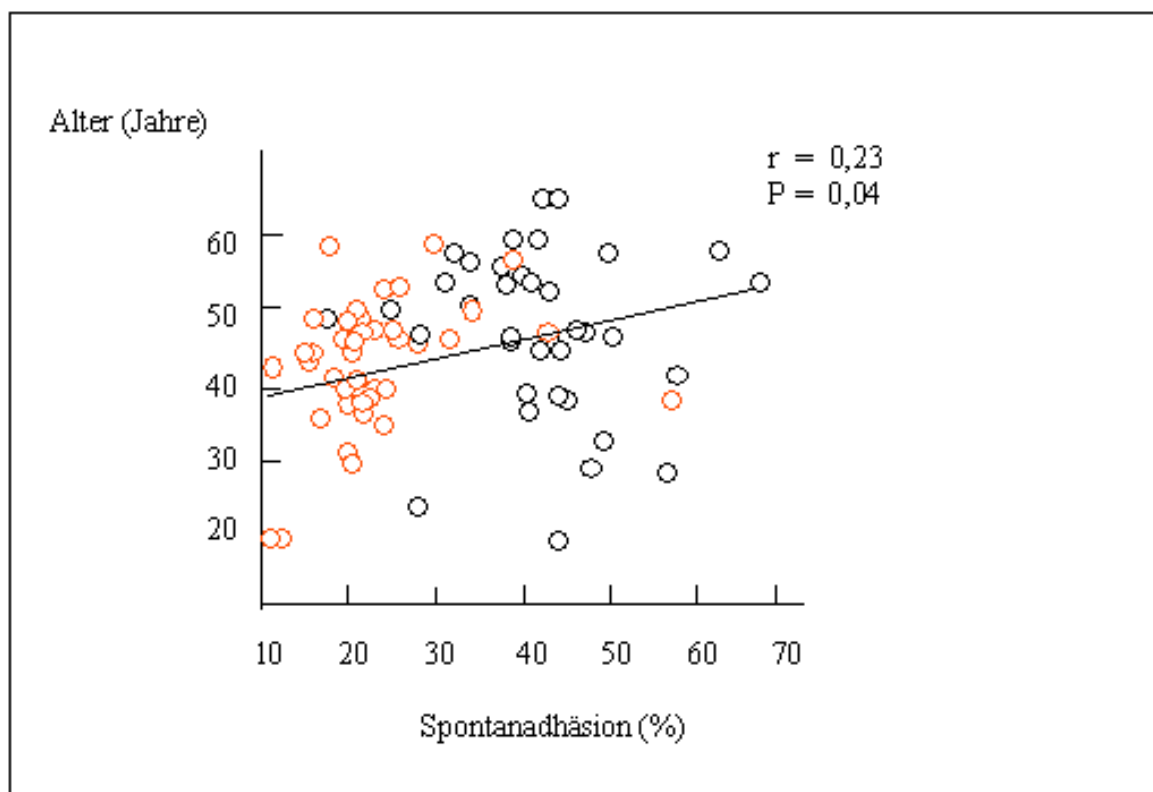


Abb. 27: Korrelation nach Pearson R des Alters der Probanden [Hypertoniker (O), Normalkontrollen (O)] mit der Spontanadhäsion der Monozyten an humane Umbilikalvenenendothelzellen.

8. Diskussion

Die Monozyten sind die Präkursorzellen des mononukleären Phagozytensystems. Die zentrale Rolle der Monozyten/Makrophagen bei Abwehrmechanismen von Infektionen, malignen Prozessen und nicht zuletzt der Atherosklerose, macht die Monozyten zu einem faszinierenden Forschungsgebiet der Immunologie und Zellbiologie. Das sekretorische Potential der Monozyten ist immens. Studien zu Oberflächenrezeptoren der Monozyten und ihrer Rolle bei der Antigenpräsentation sind im Gange. In der letzten Zeit konnten bei der Charakterisierung der für die Monozytenadhäsion verantwortlichen Rezeptoren Fortschritte erzielt werden. Die Adhäsionsmoleküle sind von umfassender Bedeutung für die Interaktion Antigen-präsentierender Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems. Die hier vorgelegte Arbeit soll einen Beitrag zur Rolle der Monozyten bei der essentiellen Hypertonie leisten.

8.1. Aktivierung peripherer Monozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie

Bereits 1995 wiesen Bataillard und Kollegen nach, dass Lyon hypertensive Ratten (LH) nach intraperitonealer Applikation von Silica, einem selektiven Monozytentoxin, einen signifikant niedrigeren Blutdruck aufwiesen als die unbehandelten Tiere (Bataillard A., 1995). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Monozyten-vermittelte Immunreaktionen in die Pathogenese der arteriellen Hypertonie von LH involviert sind.

Die meisten Studien konzentrieren sich auf Gewebsmakrophagen, welche zu Schaumzellen transformieren. Schaumzellen sind das Kennzeichen der Initialläsion der Atherosklerose (Faggitto A., 1984) und seit den 80er Jahren gibt es genügend Beweise

dafür, dass sich die meisten Schaumzellen atherosklerotischer Läsionen aus den zirkulierenden Monozyten rekrutieren (Schaffner T., 1980; Gerrity R.G., 1981).

Die vorliegenden Experimente zeigen erstmals, dass bereits zirkulierende Monozyten von Hypertonikern einen erhöhten Aktivitätszustand aufweisen. Der Aktivierungszustand der Monozyten wurde anhand der Sekretion pro-entzündlicher Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IL-6, der Superoxidproduktion und der aktivierungsabhängigen Oberflächenmarker bestimmt.

Ähnliche Ergebnisse wurden von Arbeitsgruppen berichtet, die mit hypertensiven Ratten experimentierten (Schmid-Schönbein G.W., 1991 Tsao P.S., 1998). Mittels NBT-Test (nitroblue tetrazolium reduction) wiesen Schmid-Schönbein et al. (1991) nach, dass bei erwachsenen SHR die Anzahl der aktivierten Monozyten signifikant erhöht ist.

8.1.1. Sekretion pro-entzündlicher Zytokine

Zunächst wurde die Fähigkeit isolierter peripherer Patientenmonozyten, spontan pro-entzündliche Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6) freizusetzen, untersucht. Diese pro-entzündlichen Zytokine, welche vor allem von aktivierten Monozyten und Makrophagen produziert werden (Fuhlbrigge R.C., 1987), sind Mediatoren von Entzündungsreaktionen. Spontan wurde eine vermehrte Sekretion von IL-1 β nachgewiesen, welche jedoch im Gegensatz zu der Arbeit von Dalekos nicht statistisch signifikant war (Dalekos G.N., 1997). Ursächlich können möglicherweise die erhöhten Cholesterolvere der von Dalekos eingeschlossenen Patienten (Gesamtcholesterol: 263 ± 45 mg/dl, LDL: 177 ± 43 mg/dl), zu Grunde liegen. So ist bekannt, dass eine verminderte Aufnahme von oxidierten LDL durch humane Monozyten, eine geringere IL-1 β Sekretion zur Folge haben kann (Janabi M., 2000).

Eine vermehrte Freisetzung von IL-1 β und TNF- α durch Monozyten wurde kürzlich auch von Devaraj und Jialal bei Diabetikern nachgewiesen (Devaraj S., 2000). Auch der Urin hypertensiver Schwangerer enthält mehr IL-1 β und TNF- α nach Heyl et al., nicht dagegen der Urin normotensiver schwangerer Patientinnen. Da eine zirkadiane Ausscheidungsrythmik fehlt, gehen die Autoren von einer, vom 24-Stunden Blutdruckverhalten unabhängigen, Zytokinexkretion aus (Heyl W., 1996).

Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Hypertonie die Antwort des Endothels auf Faktoren, welche die Monozytenadhäsion fördern, verstärkt. Laut Ross sind die Endothelzellen an der Aktivierung der Monozyten ursächlich beteiligt (Ross R., 1993).

Die hier vorgestellten Experimente zeigen, dass die Monozyten von Hypertoniepatienten im Vergleich mit den Zellen des peripheren Blutes von Gesunden einen erhöhten Aktivierungszustand aufweisen. Dies zeigt sich u.a. durch eine signifikant vermehrte in vitro Sekretion von IL-1 β nach Angiotensin II oder LPS Stimulation sowie von TNF- α nach LPS Stimulation. Als Kontrollgruppe dienten freiwillige Blutspender.

Angiotensin II wurde als Stimulans verwendet, da es u.a. von Endothelzellen bzw. in der Gefäßwand physiologischerweise produziert und freigesetzt wird (Lüscher T.F., 1995) sowie ein Teil der Hypertoniker erhöhte Angiotensin II Plasmaspiegel aufweisen. Auch ist die Kälte-induzierte Freisetzung von Angiotensin II (transfemorale Messungen) bei hypertensiven Patienten im Vergleich zu Normotonikern signifikant erhöht und eine Hyperinsulinämie führt lediglich bei Hypertonikern zur Angiotensin II Freisetzung, nicht bei den normotensiven Kontrollen (Gasic S., 1999). Angiotensin II ist damit das Stimulans, welches den physiologischen bzw. pathophysiologischen Verhältnissen der essentiellen Hypertonie am nächsten kommt. Ein weiterer Vorteil ist die alleinige inflammatorische Aktivierung der Monozyten als Vertreter der mononukleären Zellen,

nicht dagegen die der Lymphozyten bei eventuellen Verunreinigungen der Zellpräparationen (Kranzhofer R., 1999).

Interessanterweise verstärkte eine Stimulation der Monozyten mit Angiotensin II oder LPS bei den hier dargestellten Untersuchungen den Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen, welcher im Hinblick auf das immunregulatorische Potential dieser Zytokine von Bedeutung sein könnte. Im Unterschied zu IL-1 β sezernierten die Patientenmonozyten mit den Kontrollen vergleichbare Mengen von TNF- α und IL-6. Lediglich nach LPS Stimulation ließ sich für die Patientenmonozyten eine gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhte Sekretion von TNF- α nachweisen.

Während bei den hier vorgestellten Untersuchungen sich die Basalsekretion der pro-entzündlichen Zytokine bei Hypertonikern im Vergleich zu Normotonikern nicht signifikant unterscheidet, reagierten die Patientenmonozyten nach Stimulation hochsignifikant stärker mit der Sekretion dieser Zytokine. So kann man davon ausgehen, dass die Patientenmonozyten aufgrund einer stärkeren Stimulierbarkeit gegenüber physiologischen Stimulanzen, wie z.B. Angiotensin II oder im Rahmen von Infekten, über die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine primär zur Schädigung des Endothels und Entwicklung atherosklerotischer Prozesse beitragen können.

Das Endotoxin LPS wurde als Stimulans verwendet, da es eine seit Jahren etablierte Methode ist, LPS zur Untersuchung der maximalen Aktivierung dieser Zellen einzusetzen (Jelinek D.F., 1987). LPS aktiviert im Gegensatz zu anderen Stimulanzen die angeborene Immunantwort der Monozyten (Langstein J., 2000).

Möglicherweise geht eine vermehrte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine makroskopisch sichtbaren Entzündungszeichen voraus und kann damit potenziell ein pathophysiologisch

bedeutsames Ereignis darstellen. Diese Hypothese wird auch durch Befunde aus der Gastroenterologie gestützt, wo eine erhöhte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine durch mononukleäre Phagozyten als Prediktor für das erneute Auftreten eines akuten Schubes bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und damit als prognostischer Faktor dient (Schreiber S., 1995).

Keiner der Patienten zeigte eine erhöhte Sekretion von IL-6 im Einklang mit den unauffälligen Laborparametern wie C-reaktives Protein und Leukozyten. Die gewonnenen Ergebnisse bestätigen Untersuchungen von Kishikawa, nach denen Makrophagen aus fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen neben IL-1 und TNF- α auch IL-6 sezernieren, frühe Läsionen aber nur IL-1 und TNF- α (Kishikawa H., 1993). Es wurden für die vorgestellten Experimente Patienten mit sonographisch sichtbaren atherosklerotischen Läsionen bzw. grenzwertiger oder verdickter Intima-Media-Dicke ausgeschlossen, so dass sich aufgrund der Ausschlusskriterien ein ähnliches Zytokinmuster, wie von Kishikawa für frühe Läsionen beschrieben, ergeben hat.

Um die vermehrte Sekretion pro-entzündlicher Zytokine bis auf mRNA Ebene zu verfolgen, wurde eine semiquantitative Polymerasekettenreaktion zur Quantifizierung von pro-entzündlicher Zytokin mRNA durchgeführt. Korrespondierend zu den entsprechenden Proteinen zeigten sich auch erhöhte mRNA Konzentrationen des Interleukin-1 β - und TNF- α -Gens nach LPS bzw. für IL-1 β auch nach Angiotensin II Stimulation. TNF- α , induziert durch LPS, triggert u.a. die Synthese von IL-1 β und IL-6 (Beutler B., 1988).

TNF- α und IL-1 β spielen bei der Atherogenese eine nicht unbedeutende Rolle. Sie verursachen Alterationen der Endothelzellen in vivo (Hicks C., 1989). IL-1 steigert laut Bevilacqua die Adhärenz von Monozyten (U-937-Zelllinie) und Endothelzellen

(Bevilacqua M.P., 1985) durch die verstärkte Expression von ICAM-1 (DeSouza C.A., 1997). TNF und IL-1 induzieren eine vermehrte koagulatorische Aktivität kultivierter Endothelzellen vermutlich über die Bildung von PDGF (platelet derived growth factor), das in den Prozess der Atherogenese involviert ist (Bevilacqua M.P., 1986). Dabei induziert IL-1 die PDGF Produktion glatter Muskelzellen (Ross R., 1987) und TNF- α die PDGF Produktion von Endothelzellen (Hajjar K.A., 1987).

Wick geht als initiierendem Ereignis der Atherogenese sogar von einer Autoimmunreaktion gegen HSP 60 (heat-shock protein), welches von dem Endothel nach Kontakt mit TNF- α exprimiert wird, aus. Parallel dazu werden laut Wick ICAM-1 und VCAM-1 von humanen Endothelzellen exprimiert (Wick G., 1995).

Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen, dass Angiotensin II in der Lage ist, Monozyten zu aktivieren. Interessanterweise triggert Angiotensin II die IL-1 β Produktion der Monozyten ohne die Produktion von TNF- α signifikant zu erhöhen. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass der Angiotensin II Signaltransduktionsmechanismus der Monozyten gegenüber der durch Endotoxin ausgelösten Signaltransduktion different ist. Während NF κ B (Nuklearfaktor-kappa B) und AP-1 (Aktivator Protein-1) die Hauptrolle in der LPS-vermittelten TNF- α Produktion der Monozyten spielen (Libermann T.A., 1990; Kyriakis J.M., 1999; Medvedev A.E., 2000), scheint die IL-1 β Regulation durch Angiotensin II andere Wege zu gehen. So induziert LPS die Aktivierung der IL-1 Rezeptor-assoziierten Kinase (Swanek J.L., 2000). Angiotensin II führt dagegen über den AT1- Rezeptor zur Aktivierung der Tyrosinkinase Rezeptoren (Saito Y., 2001).

Nach Inkubation der Monozyten mit dem AT1-Rezeptorantagonisten Losartan vor der Angiotensin II Stimulation war kein signifikanter Unterschied der IL-1 β Sekretion von Patienten und Kontrollen mehr nachweisbar. Losartan reduziert den Aktivierungszustand

der Monozyten in vitro. Es blockiert die Aktivierung des pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ -B durch Angiotensin II in Monozyten (Kranzhofer R., 1999). Die hier dargestellten Ergebnisse weisen daraufhin, dass die IL-1 β Sekretion peripherer Monozyten über den AT1-Rezeptor reguliert wird.

8.1.2. Superoxidproduktion

Funktionelle Untersuchungen an peripheren Monozyten von Hypertoniepatienten konnten auch eine vermehrte Sensibilisierung dieser Zellen nachweisen. Als weiterer Parameter zur Beurteilung des Aktivitätszustandes wurde die Fähigkeit von Monozyten, nach Stimulation mit PMA oder Angiotensin II Superoxidanionen freizusetzen, gewählt. PMA ist die beste Substanz zur Testung der Proteinkinaseaktivität, welche eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der NADPH Oxidase spielt.

Die erhöhte Superoxidfreisetzung weist ein hohes pathogenetisches Potential auf, da die Superoxidradikale zur Bildung des atherogenen oxidierten LDL führen können, welches zytotoxisch gegenüber den Zellen der arteriellen Gefäßwand wirkt sowie entzündliche und thrombotische Prozesse stimuliert (Aviram M., 1998; Ross R., 1999). Sinkt die Aufnahme von oxidiertem LDL wie z.B. in den Monozyten/Makrophagen von CD36-Defizit Patienten, sezernieren diese Zellen auch signifikant weniger TNF- α und IL-1 β im Vergleich zu den Kontrollen (Janabi M., 2000). Nach einer Arbeit von Volk et al. steigt die TNF- α Synthese proportional mit der Superoxidproduktion. Dabei wurde immunfluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen, dass die Monozyten die Hauptproduzenten von TNF- α sind (Volk T., 1999).

Die vorliegenden Experimente ergaben, dass periphere Monozyten von Hochdruckpatienten in unterschiedlichem Maß eine erhöhte Kapazität zur Freisetzung von Superoxid aufwiesen. Die maximale Chemilumineszenz als Aktivierungsmarker war nach PMA Stimulation bei den Patienten gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Diese Ergebnisse ergänzen die Arbeit von Sagar et al., die eine vermehrte Superoxidproduktion durch polymorphkernige Granulozyten bei der essentiellen Hypertonie nachwiesen (Sagar S., 1992).

Eine vermehrte Superoxidproduktion von Monozyten wurde auch bei entzündlichen Erkrankungen wie dem M. Crohn (Kitahora T., 1988), dem Asthma bronchiale (Vachier I., 1992) und der Autoimmunvaskulitis (Bruce I., 1997) nachgewiesen.

Neben der signifikant erhöhten Sekretion pro-entzündlicher Zytokine, führte Angiotensin II auch zur vermehrten Superoxidproduktion. Nach Laursen ist die Angiotensin II induzierte Hypertonie der Ratte zumindest partiell durch eine vermehrte Superoxidproduktion begründet, da applizierte Superoxiddismutase zu einer signifikanten Blutdruckreduktion führt, bei Katecholamin induzierten Hypertonie dagegen keine Wirkung zeigt (Laursen J.B., 1997). Fukai wies allerdings nach, dass Angiotensin II selbst die Expression der vaskulären Superoxiddismutase unabhängig von dem Hypertonus steigert (Fukai T., 1999).

Laut Ross handelt es sich bei der Atherosklerose um eine entzündliche Erkrankung (Ross R., 1999). Allerdings sieht Ross die inflammatorische Aktivität u.a. in einer vermehrten Superoxidproduktion der Gefäßwand begründet, das zwar die NO Bildung der Endothelzellen nicht senkt, aber die Bioverfügbarkeit durch oxidative Inaktivierung reduziert (Kojda G., 1999) sowie die Leukozytenadhäsion steigert (Swei A., 1997). Endothelzellen der Aortensegmente spontan hypertensiver Ratten setzen 120 % mehr

Superoxidanionen frei als die Kontrollen (Kojda G., 1999). Wurden humane Umbilikal-venenendothelzellen in einem in vitro System von Molenaar und Kollegen Hydroperoxid ausgesetzt, verdoppelte sich die Monozytenadhärenz (Molenaar R., 1989). Die Chemilumineszenzaktivität postkonfluenter HUVEC war in dem vorgestellten System im Vergleich zu der Chemilumineszenzaktivität der Monozyten vernachlässigbar gering, was die Hypothese von Ross nicht unterstützen würde. Allerdings sind humane Umbilikal-venenendothelzellen hinsichtlich der Superoxidproduktion sicherlich nicht mit arteriellen Patientenendothelzellen vergleichbar.

Wurden die Monozyten neben PMA mit LPS stimuliert, ließ sich lediglich bei den Kontrollen eine weitere Steigerung der Superoxidproduktion nachweisen, nicht dagegen bei den Patienten. LPS ist als direktes Stimulans der Superoxidproduktion humaner Monozyten bekannt (Landmann R., 1995), so dass die fehlende Stimulierbarkeit der Patientenmonozyten verwundert. Möglicherweise sind die sensibilisierten Monozyten von Hypertonikern im Gegensatz zu den Monozyten gesunder Kontrollen mit PMA bereits maximal stimuliert worden.

Diese Befunde sind als Hinweise auf eine Störung der Monozytenfunktion bei Hypertonikern zu werten, da neben der Transkription und Sekretion pro-entzündlicher Zytokine auch ein anders reguliertes System wie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetaboliten betroffen ist.

8.1.3. Aktivierungsabhängige Oberflächenmarker

Phänotypische Hinweise auf einen vermehrten Aktivierungszustand ergaben die durchflusszytometrischen Untersuchungen isolierter mononukleärer Zellen von

Hypertonikern. Es zeigte sich, dass die untersuchten aktivierungsassoziierten Antigene in einem erhöhten Prozentsatz von peripheren Monozyten der Patienten exprimiert wurden.

Eine signifikant erhöhte Expression fand sich für ICAM-1 (CD54), welches zur Immunglobulin Superfamilie der Adhäsionsmoleküle gehört sowie für LFA-1 (CD11a) und MAC-1 (CD11b), die Liganden oder Counterrezeptoren von ICAM-1. LFA-1 und MAC-1 gehören zur Gruppe der β_2 -Integrine. Die transendotheliale Migration der Monozyten wird durch LFA-1 vermittelt (Shang X.Z., 1999). Die β_2 -Integrinrezeptoren sind aber auch Bindungsmoleküle für Bakterien und LPS (Ammon C., 2000). Normalerweise befinden sich die Integrinrezeptoren zirkulierender Monozyten in einem inaktiven Zustand (Raines E.W., 1996). Die gesteigerte Expression unterstützt die Hypothese, dass eine vermehrte Aktivierung des Immunsystems bei der Hypertonie stattfindet.

Nach Kalra et al. wird der Ligand CD11b auf der Oberfläche peripherer Monozyten auch nach Kontakt mit Zigarettenrauchkondensat exprimiert, was zu einer verstärkten Adhärenz an Endothelzellen führt, die mittels monoklonalem CD11b-Antikörper blockierbar ist (Kalra V.K., 1994). Da die Probanden sich nur aus Nichtrauchern zusammensetzten, scheidet dieser Aktivierungsmechanismus der Monozyten für unsere Patientenpopulation aus.

Zeitgleich mit den hier gewonnenen Daten, berichtete Takemori über eine vermehrte MAC-1 (CD11b) Expression der Monozyten SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rats) im Vergleich mit Wistar Kyoto Ratten und eine Reduktion der MAC-1 Expression nach oraler Gabe eines AT1-Rezeptorantagonisten (Takemori K., 2000). Wurden die peripheren Monozyten in unseren Versuchsreihen vor FACS Analyse mit Losartan vorinkubiert, ließ sich keine Reduktion der MAC-1 Expression nachweisen (Ergebnisse nicht dargestellt.). Allerdings ist der Einsatz von AT1-Rezeptorantagonisten

in vivo (0,5 mg/kg/d oral) über 4 Wochen im Tierexperiment, nicht mit einer 30 minütigen Vorinkubation humaner Monozyten in vitro vergleichbar, zudem die Patienten- (n = 12) wie Versuchstierzahlen (n = 7) gering ausfielen.

Die Oberflächenmarker CD29 (VLA-1, ein β_1 -Integrin), CD31 (PECAM-1, aus der Ig Superfamilie), CD44 (H-CAM) und CD49 (VLA-4, ein β_1 -Integrin) waren nicht bzw. nicht signifikant erhöht.

CD29 hat als Liganden Laminin und wurde als interne Kontrolle mitgeführt. Die Expression von CD29 erfolgt normalerweise während der Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen (Ammon C., 2000). CD31 wird vor allem von Gefäßzellen und Thrombozyten exprimiert und ist für die Transmigration zuständig. CD44 weist als Liganden Hyaluronat und Kollagen auf, wird hauptsächlich von B- und T-Zellen exprimiert und ist in das Lymphozytenhoming involviert. Eine vermehrte Expression von CD29, CD31 und CD44 war aufgrund der minimalen Expression durch Monozyten kaum zu erwarten.

CD49 wird neben den Lymphozyten in erheblichem Maße von Monozyten exprimiert, Liganden sind VCAM-1 und Fibronectin. Es ist u.a. für das Leukozyten Rolling, die Adhäsion und Migration zuständig, so dass eine vermehrte Expression durch Patienten-monozyten erwartet wurde, zudem VCAM-1 im Serum der Patienten erhöht war. Bei genauer Betrachtung der gemessenen Werte (Patienten: $164,0 \pm 171,5$; Kontrollen: $108 \pm 113,9$ counts, $P = 0,14$) kommt allerdings der Verdacht auf, dass lediglich aufgrund der hohen Standardabweichung kein signifikanter Unterschied nachweisbar war.

8.2. Adhäsion

Die Hypertonie ist mit einer vorzeitigen Atherosklerose vergesellschaftet (Keidar S., 1998; Kannel W.B., 2000). So wurde von Clozel und Mitarbeitern gezeigt, dass bei der Hypertonie eine endotheliale Dysfunktion sowie eine subendotheliale Akkumulation von Monozyten vorliegen. Die Untersuchungen wurde an SHR durchgeführt. Die subendotheliale Infiltration mit Monozyten wurde morphometrisch ermittelt und die endotheliale Dysfunktion wurde mittels Serotonin Quotienten (maximale Kontraktion isolierter arterieller Ringe mit Endothel unter Serotonin zu der maximalen Kontraktion ohne Endothel) bestimmt (Clozel M., 1991). Möglicherweise sind diese Veränderungen teilweise in der vermehrten Sekretion von IL-1 β und TNF- α durch Monozyten von SHR begründet.

In Tiermodellen wurde bereits mehrfach nachgewiesen, dass Monozyten eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen spielen (Gerrity R.G., 1981; Ross R., 1986). Leider gibt es so gut wie keine Arbeiten zur Rolle der Monozyten bei essentiellen Hypertonikern.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurden Patienten mit Hypercholesterinämie ausgeschlossen, da seit den 90er Jahren eine gesteigerte Monozytenadhärenz an das Endothel durch Hypercholesterinämien aus Tiermodellen sowie humanen Versuchen bekannt ist (Gimbrone M.A., 1990; Cybulsky M.I., 1991), darüber hinaus kürzlich über eine höhere IL-1 β und TNF- α Expression durch Monozyten von Patienten mit Hypercholesterinämie berichtet wurde (Ferro D., 2000) und die Validität der Messergebnisse durch zusätzliche Risikofaktoren der Arteriosklerose nicht eingeschränkt werden sollte.

Es erfolgte weiterhin ein Ausschluss sämtlicher Patienten mit einer Intima-Media-Dicke der A.carotis $\geq 0,7$ mm für die Adhäsionsversuche und Chemilumineszenzmessungen und $> 0,75$ mm für sämtliche Experimente. Diese Entscheidung basierte vor allem auf den Ergebnissen der Übersichtsarbeit von Aminbakhsh und Mancini sowie der Arbeit von Ferrieres (Aminbakhsh A., 1999; Ferrieres J., 1999). Die erwähnte Übersichtsarbeit wies ein erhöhtes Risiko einen Apoplex zu erleiden, bei einer Intima-Media-Dicke $\geq 0,75$ mm nach. Ferrieres konnte nachweisen, dass bei Ausschluss aller Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit die durchschnittliche Intima-Media-Dicke bei 0,6 mm lag und schlussfolgerte daraus, dass die in der Literatur angegebenen Intima-Media-Dicken von Hochrisiko-Patienten mit einer lokalen Atherosklerose vergesellschaftet sind (Ferrieres J., 1999).

8.2.1. Adhäsionsmoleküle im Serum

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstützen die Arbeit von DeSouza, die erhöhte ICAM-1 und VCAM-1 Serumspiegel bei Hypertonikern nachwies (DeSouza C.A., 1997).

Unklar bleibt die Genese der erhöhten Adhäsionsmoleküle im Serum von Hypertonikern. Einerseits führt Scherstress zu einer vermehrten Expression von ICAM-1 (Nagel T., 1994), andererseits könnten aktivierte Monozyten dafür verantwortlich sein, da TNF- α und IL-1 zu einer Hochregulation der ICAM-1 und VCAM-1 Expression von Endothelzellen führen (Davies M.J., 1993).

ICAM-1 und VCAM-1 werden hauptsächlich von Endothelzellen aber auch von Monozyten produziert; E-Selektin wird dagegen ausschließlich von Endothelzellen produziert (Bevilacqua M.P., 1989).

Da hier lediglich erhöhte ICAM-1 und VCAM-1 Serumkonzentrationen der Patienten nachgewiesen wurden, könnte dies unsere Hypothese, dass die aktivierten Monozyten für die hohen Serumspiegel in einem frühen Stadium der Hypertonie vor jeglichen Endothelzellläsionen verantwortlich sind, stützen. Das würde auch die diskrepanten Befunde von Blann und Kollegen erklären, welche bei Hypertonikern signifikant erhöhte E-Selektin Konzentrationen im Serum nachwiesen, aber nicht Patienten mit sonographisch nachweisbaren atherosklerotischen Läsionen bzw. grenzwertiger Intima-Media-Dicke ausschlossen (Blann A.D., 1994). Möglicherweise wird E-Selektin erst von einem alterierten Endothel sezerniert.

ICAM-1, ein Protein der Ig Superfamilie, ist einer der Liganden für LFA-1 (CD11a). Eine vermehrte ICAM-1 Expression der Endothelzellen ist mit einer gesteigerten Adhäsion von Monozyten an die Intima assoziiert. 85 % der Makrophagen in Initialläsionen exprimieren LFA-1, was laut Watanabe auf die Einbindung des LFA-1/ICAM-1 Rezeptorliganden-Systems in die Rekrutierung der Monozyten hinweist (Watanabe T., 1998). Ein von Watanabe et al. injizierter monoklonaler Anti-ICAM-1/LFA-1 Antikörper reduzierte signifikant die Adhärenz der Monozyten an die aortale Intima der Ratten.

Die vorgestellten Ergebnisse wiesen sowohl erhöhte ICAM-1 Spiegel im Serum von hypertensiven Patienten wie auch eine vermehrte Expression von CD11a (LFA-1) auf der Monozytenoberfläche nach.

Komatsu et al. zeigten, dass die differente ICAM-1 Expression von SHR und Wistar Kyoto Ratten nicht durch Veränderungen der Endotheloberfläche begründet ist, da sich die endotheliale ICAM-1 Expression nicht unterschied. Sie vermuten dagegen eine mit der Hypertonie assoziierte abnorme Entzündungsreaktion (Komatsu S., 1997), was durch unsere Untersuchungen am Menschen gestützt würde.

Aufgrund der erhöhten Adhäsionsmoleküle im Serum verwendeten wir ausschließlich HUVEC für die Adhäsionsversuche, um eine Aktivierung der Endothelzellen auszuschließen. Da bekanntermaßen auch der von Willebrand Faktor als Hinweis auf eine endotheliale Dysfunktion im Plasma von hypertensiven Patienten erhöht ist (Blann A.D., 1996, Goonasekera C.D., 2000), schloß sich die Verwendung von Patientenendothelzellen aus. Die Superoxidfreisetzung der HUVEC war im Vergleich mit der Superoxidproduktion der Monozyten vernachlässigbar gering.

8.2.2. Adhäsion peripherer Monozyten an HUVEC

Zahlreiche Studien gehen davon aus, dass die Adhärenz von Monozyten an das Endothel der entscheidende Schritt in der Ausbildung atherosklerotischer Veränderungen ist (Watanabe T., 1998; Gerszten R.E., 1999). Daher untersuchten wir die Adhäsion isolierter Monozyten an humane Umbilikalvenenendothelzellen und stellten dabei fest, dass bereits unstimulierte Monozyten von Hypertoniepatienten eine stärkere Adhäsion an HUVEC aufweisen als die Monozyten gesunder Kontrollen. So könnte die vermehrte Expression von CD11b auf den Patientenmonozyten ein ursächlicher Faktor für die erhöhte Adhäsion an Endothelzellen in vitro sein.

Eine erhöhte Adhäsion von humanen Monozyten an Endothelzellen wurde kürzlich von Devaraj auch bei Diabetikern nachgewiesen (Devaraj S., 2000). Interessanterweise hatten von 50 rekrutierten Diabetiker 25 eine diabetische Makroangiopathie und von diesen, 16 Patienten einen Hypertonus. Von den restlichen 25 Diabetikern litten weitere 9 Patienten zusätzlich an einer Hypertonie.

Artigues berichtete über eine gesteigerte Adhäsion von Monozyten an arterielle Endothelzellen bei Dahl Ratten, die nach kochsalzreicher Diät (8 %) einen Hypertonus

ausgebildet hatten. Als Ursache wurde u.a. eine verminderte NO Produktion vermutet (Artigues C., 2000).

In den letzten Jahren wird die entzündliche Genese der Atherosklerose und die potenzielle Bedeutung der pro-entzündlichen Zytokine heftig diskutiert (Boring L., 1998; Ross R., 2000).

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass Angiotensin II aktivierte Monozyten zur Adhäsion an Endothelzellen führen können und damit das Risiko für atherosklerotische Läsionen erhöhen. Ultraschallstudien der Carotiden zeigen eine positive Korrelation zwischen Hypertonus und dem Nachweis von Plaques an der Arterienwand, insbesondere bei Patienten mit hohen Reninspiegeln (Lusiani L., 1990).

In einer prospektiven Studie mit 1717 Hochdruckpatienten, die anhand ihres Reninspiegels klassifiziert und über 8,3 Jahren beobachtet wurden, wies Aldermann nach, dass die Inzidenz eines Myokardinfarktes bei den Patienten mit hohem Reninspiegel zwei- bis fünffach höher war als bei Patienten mit niedrigen oder normalen Reninwerten. Die Plasma-Reninaktivität war ein stärkerer Prädiktor für den Myokardinfarkt als Cholesterolspiegel, Alter, Geschlecht, BMI oder diastolischer Blutdruck (Aldermann M.H., 1991).

Zur Vermeidung einer Angiotensin II induzierten Monozytenaktivierung haben sich AT1-Rezeptorantagonisten in vitro als brauchbar erwiesen. So führt eine Vorinkubation der Patientenmonozyten mit Eprosartan zur Reduktion der Adhäsion an HUVEC nach Angiotensin II Stimulation. Möglicherweise stellen sie ein neues Therapeutikum zur Prävention der Arteriosklerose dar. Angiotensin II führt nach der Arbeit von Hayek auch zu einer vermehrten Aufnahme oxidierten LDL's durch Makrophagen, welche durch Losartan in vivo um 78 % reduziert wurde (Hayek T., 2000).

Als Antwort auf eine LPS Stimulation wird bekannterweise die Expression von Adhäsionsmolekülen durch das vaskuläre Endothel angeregt (Luhm J., 1997). Die vorgelegten Experimente konnten allerdings nach LPS Stimulation keinen signifikanten Unterschied zwischen der Adhäsion von Patienten- bzw. Kontrollmonozyten an HUVEC nachweisen, vermutlich aufgrund einer primär maximalen bzw. Überstimulierung der Zellen.

8.3. Korrelationen der Monozytenadhäsion und Zytokinsekretion mit Alter und Blutdruck der Probanden

Aufgrund des Designs der vorliegenden Untersuchungen kann nicht geschlussfolgert werden, ob die aktivierten Monozyten nur als ein Epiphänomen des hohen Blutdruckes oder als ein ursächlicher Faktor bezüglich der Hypertonie und arteriosklerotischer Folgeerkrankungen anzusehen sind.

Singhal et al. berichteten 1997, dass die Migration humaner Monozyten (U 937) durch einen Filter in direkter Beziehung zu der Höhe des applizierten Druckes stand (Singhal P.C., 1997). Allgemein bekannt ist auch, dass der Blutdruck zur Ausbildung atherosklerotischer Läsionen eine bestimmte Höhe haben muss, z.B. entstehen keine atherosklerotischen Plaques in Venen bzw. Pulmonalarterien.

Die Arbeitsgruppe um Strawn geht davon aus, dass Endothelläsionen hypertensiver transgener Ratten (TGR(mRen2)27) primär durch den erhöhten Blutdruck verursacht werden, da sie nach Hydralazin regredient sind, wogegen die Monozytenaktivität an eine Aktivierung des Renin-Angiotensin Systems gekoppelt sei (Strawn W.B., 1999).

Allerdings beobachteten wir keine positive Korrelation der Monozytenadhäsion an HUVEC mit dem Blutdruck der Probanden und nur eine geringgradige positive Korrelation mit dem Alter. Die nur geringe Korrelation mit dem Alter der Probanden könnte durch den Ausschluss von Rauchern, Patienten mit erhöhtem LDL, mit grenzwertiger Intima-Media-Dicke oder atherosklerotischen Läsionen aus der Studie begründet sein. Im Gegensatz dazu wiesen die gesunden Probanden bei gleichen Ausschlusskriterien eine hohe Korrelation der Monozytenadhäsion mit dem Alter, bei insgesamt signifikant geringerer Adhärenz, auf. Offensichtlich weisen die Monozyten der Hypertoniker eine verstärkte Adhäsivität auf, die durch ein höheres Patientenalter nicht nennenswert gesteigert wird.

Nach Angiotensin II Stimulation ließ sich für TNF- α und IL-1 β eine positive Korrelation mit dem systolischen Blutdruck der Patienten nachweisen, jedoch keine Korrelation mit dem Alter. Offenbar ist für die Hypertoniepatienten die Höhe des systolischen Blutdruckes auch in Bezug auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine entscheidender als das Patientenalter.

In der Literatur wurde dagegen wiederholt über höhere IL-1 und TNF Spiegel in hohem Alter berichtet (Mooradian A.D., 1990; Liao Z., 1993). Dabei wurden Patientenpopulationen von 80-95 Jahren mit denen von 25-35 Jahren verglichen. Die in der vorgelegten Arbeit involvierten Patienten wiesen jedoch ein mittleres Alter von 47 Jahren auf, kein Patient war älter als 64 Jahre. Arbeitsgruppen, die nur Probanden ohne jegliche Erkrankung oder Infektion einschlossen, konnten ebenfalls keine erhöhte IL-1 oder TNF- α Produktion humaner Monozyten im Alter nachweisen (Rudd A.G., 1989; Mysliwska J., 1999).

8.4. Methodenkritik

Primär stellte sich die Frage, ob die Aktivierung der Monozyten in der Isolierungsmethode (Dichtegradientenzentrifugation und Plastikadhärenz) begründet ist. Um Spekulationen dieser Art zu vermeiden, wurden die Monozyten nach Verfügbarkeit der Dynabeads[®] Methodik für Monozyten 1999 nur noch mit dieser isoliert, womit die Plastikadhärenz wegfiel (Romani N., 1996). Im Vergleich unterschieden sich die Ergebnisse der Experimente nicht signifikant.

Leider gibt es bisher keine Methodik, welche eine Isolierung der Monozyten ermöglicht, ohne zumindest eine geringe Aktivierung der Zellen zu verursachen, insbesondere bei Verarbeitung von kleinen Blutvolumina (Gmeling-Meyling F., 1980). Stent und Crowe verglichen 1997 verschiedene Isolierungsmethoden hinsichtlich der Expression von aktivierungsabhängigen Oberflächenmolekülen auf den Monozyten (Stent G., 1997). Nach Plastikadhärenz bis zu zwei Stunden fand sich im Vergleich mit der Elutriation keine vermehrte Expression von CD54 und Integrinen. Bei der hier dargestellten Isolierung erfolgte eine Plastikadhärenz von nur einer Stunde.

Eine mögliche Aktivierung der Monozyten durch die Isolierungsmethode schien zudem von geringer Bedeutung, da nicht die Absolutwerte, sondern der Vergleich der Patientenmonozyten mit denen der Normalkontrollen von Relevanz war.

Bis heute kann man allerdings nicht ausschließen, dass nur Subgruppen von Monozyten zirkulieren und nur diese somit zugänglich waren.

Bei der Verwendung der humanen Umbilikalvenenendothelzellen galt es vor allem, Zeitlimits zu beachten. HUVEC wurden ausschließlich nach ein- bis dreimaliger Passage - 48 h vor Verwendung im Adhäsionassay eingesetzt, da in vitro gealterte HUVEC eine erhöhte Monozytenadhärenz aufweisen (Molenaar R., 1989).

Zur Überprüfung der Validität des Adhäsionsassays isolierter Monozyten an HUVEC nach Hahn wurde ein zweiter Adhäsionsassay nach McCarron durchgeführt, bei welchem die Adhäsion nicht mittels Auszählens per Hand, sondern anhand der Radioaktivität der adhären Zellen im Gamma Counter ermittelt wurde (Hahn A.W.A., 1994). Der bei 50 % der Adhäsionsversuche parallel durchgeführte Assay nach McCarron ergab nahezu identische Ergebnisse (McCarron R.M., 1994).

Aufwendig und langwierig gestaltete sich auch der Einschluss der Probanden. Das hier vorgestellte Patientengut wurde aus einem großen Pool ausgewählt. Da nur ein geringer Prozentsatz der Hypertoniepatienten die Einschlusskriterien erfüllte, zogen sich die Experimente über 4-5 Jahre hin. So haben z.B. über 40 % der hypertensiven Patienten nach Literaturangabe Plasma Cholesterolverte über 240 mg/dl (Working group on management of patients with hypertension and high blood cholesterol, 1991).

Nach neuester Literatur weisen adipöse Menschen ebenfalls erhöhte VCAM-1 Konzentrationen im Serum auf (Ferri C., 1999), obwohl der BMI der eingesetzten Patienten im Durchschnitt normwertig war, lagen 23 Patienten darüber und könnten somit die VCAM-1 Werte negativ beeinflusst haben. Allerdings waren auch 17 gesunde Probanden leicht übergewichtig.

Die hohen Standardabweichungen bei den Zytokinmessungen, Chemilumineszenzen und Adhäsionwerten insbesondere der Patientengruppe, unterstützen die Hypothese von Palù, dass nicht nur die Genese der essentiellen Hypertonie multifaktoriell und polygen ist, sondern dass es auch Subgruppen von Hypertonikern mit unterschiedlichem Arterioskleroserisiko gibt (Palù C.D., 1996). Darauf weisen auch neuere Arbeiten zu Genpolymorphismen essentieller Hypertoniker hin (Giner V., 2000). So wurde über ein heterogenes Ansprechen essentieller Hypertoniker auf Angiotensin II berichtet. Spiering

et al. konnten nachweisen, dass der A(1166)C Polymorphismus des Angiotensin II AT1-Rezeptorgens zu der Variabilität der Reaktionen auf Angiotensin II beiträgt. Sie untersuchten Patienten mit 3 Genotypen (AA, AC, CC). Patienten mit dem C Allel des AT1-Rezeptors zeigten eine erhöhte Sensitivität gegenüber Angiotensin II (Spiering W, 2000). Insbesondere nach Angiotensin II Stimulation der Monozyten schwankten die ermittelten IL-1 β -, TNF- α -, Chemilumineszenz- und Adhäsionswerte der Patientengruppe stark, was einerseits in der Statistik zu hohen Standardabweichungen führte, andererseits die Untersuchungen von Spiering bestätigt.

8.5. Fazit

Die vorgestellte Arbeit befasste sich mit bestimmten Zellen der Hypertoniker - den Monozyten, um die Frage zu beantworten, ob außer Elektrolytverschiebungen, hormonellen Veränderungen, dem Wirken einiger Metaboliten und nervalen Komponenten, bereits periphere Zellen verändert sind, die immunologische bzw. pro-inflammatorische Mechanismen beeinflussen und einen entscheidenden Beitrag zu Folgeerscheinungen wie der Arteriosklerose leisten.

Die hier erstmals nachgewiesene Aktivierung der Monozyten von hypertensiven Patienten unterstützt die in letzter Zeit diskutierten Hypothesen zu genetischen Ursachen der essentiellen Hypertonie. So sollen Genpolymorphismen z.B. die Sensitivität für Kochsalz oder Metaboliten wie Angiotensin II verändern (Luft F.C., 1998; Kurokawa K., 1998; Spiering W., 2000).

Andererseits wird die Diskussion um die immunologischen Veränderungen bei der essentiellen Hypertonie um die Komponente der Monozytenaktivierung erweitert.

Noch interessanter erscheinen die vorliegenden Ergebnisse in Bezug auf die Entwicklung atherosklerotischer Veränderungen beim Hypertoniker. Die keineswegs angefochtene Hypothese einer ursächlichen Endothelzellläsion müsste lediglich um die ebenfalls – zumindest beim Hochdruckpatienten – primär aktivierten und vermehrt adhärenen Monozyten als partiellem Verursacher atherosklerotischer Läsionen erweitert werden. Schließlich wurden nur humane Umbilikalvenenendothelzellen mit im Vergleich minimaler Superoxidproduktion verwendet, so dass eine Aktivierung der Monozyten im Adhäsionsassay durch Endothelzellen ausgeschlossen werden kann. Wurden die Monozyten möglicherweise durch die Isolierungsmethoden aktiviert, ist damit noch nicht die signifikant erhöhte Adhärenz der Patientenzellen, gegenüber denen der gesunden Probanden zu erklären.

Die vorgestellten Befunde sind für die Pathogenese der vorzeitigen sowie vermehrten atherosklerotischen Veränderungen essentieller Hypertoniker von Bedeutung und unterstützen die Hypothese einer inflammatorischen Genese der Atherosklerose.

9. Abkürzungen

ABDM	- Ambulante monitorisierte Blutdruckmessung
AP	- Aktivator Protein
APC	- Allophycocyanin
ANF	- Antikörper gegen nukleäre Strukturen
BMI	- Body mass index
BSG	- Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	- Cluster of differentiation
CL	- Chemilumineszenzaktivität
CRP	- C-reaktives Protein
DMSO	- Dimethylsulfoxid
ECGM	- Endothelial cell growth medium
EDTA	- Ethylenediaminetetraacetic acid
ELAM	- Endothelial leukocyte adhesion molecule
ELISA	- Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	- Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	- Fetal calf serum
FITC	- Fluoreszinsisothiocyanat
FMLP	- Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	- Forward-height-scatter
Gluc	- Glukose im Plasma
Hb	- Hämoglobin
HBSS	- Hank`s balanced salt solution
HDL	- High density lipoprotein

HSA	- Humanes Serumalbumin
HSP	- Heat-shock protein
HUVEC	- Humane Umbilikalvenenendothelzellen
ICAM	- Intercellular adhesion molecule
IL	- Interleukin
JNC	- Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure
KHK	- Koronare Herzkrankheit
LDL	- Low density lipoprotein
LFA	- Leukocyte function antigens
LH	- Lyon hypertensive Ratten
LPS	- Lipopolysaccharide
MAC	- Membrane attack complex
MCP	- Monocyte chemoattractant protein
NBT	- Nitroblue tetrazolium reduction
NFκB	- Nuklearfaktor kappa-B
oGTT	- oraler Glukosetoleranztest
PAF	- Platelet aggregating factor
PBS	- Phosphate buffered saline
PCR	- Polymerasekettenreaktion
PDGF	- Platelet-derived growth factor
PECAM	- Platelet endothelial cell adhesion molecule
PMA	- Phorbol-Myristyl-Acetat
RAS	- Renin-Angiotensin System
RPE	- R-Phycoerythrin

RPMI	- Roosevelt Park Memorial Institute - Medium
RT	- Reverse Transkriptase
SD	- Standardabweichung
SHR	- Spontan hypertensive Ratten
SHRSP	- Stroke-prone spontaneously hypertensive rats
SPSS	- Statistical Package
SSC	- Sideward-height-scatter
TGF	- Transforming growth factor
TNF	- Tumor Nekrose Faktor
VCAM	- Vascular cell adhesion molecule
VLA	- Very late antigen
WKY	- Wistar Kyoto Ratten

10. Literaturverzeichnis

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *FASEB J* 1990; 4:2860-2867

Aldermann MH, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealy JE, Laragh JH. Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *N Engl J Med* 1991;324:1098-1104

Aminbakhsh A, Mancini GB. Carotid intima-media thickness measurements: what defines an abnormality? A systematic review. *Clin Invest Med* 1999;22:149-157

Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M. Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte derived dendritic cells. *Immunology* 2000;100:364-369

Arnould T, Michiels C, Remacle J. Increased PMN adherence on endothelial cells after hypoxia: involvement of PAF, CD18/CD11b, and ICAM-1. *Am J Physiol* 1993;264:C1102-C1110

Artigues C, Richard V, Roussel C, Lallemand F, Henry JP, Thuillez C. Increased endothelium-monocyte interactions in salt-sensitive hypertension: effect of L-arginine. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000;35:468-473

Aviram M, Fuhrmann B. LDL oxidation by arterial wall macrophages depends on the oxidative status in the lipoprotein and in the cells: Role of prooxidants vs. antioxidants. *Mol Cell Biochem* 1998;188:149-159

Ba D, Takeichi N, Kodama T, Kobayashi H. Restoration of T-cell depression and suppression of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR) by thymus grafts or thymus extracts. *J Immunol* 1982;128:1211-1216

Baird IM. Obesity and insurance risk: the insurance industry's viewpoint. *Pharmacoeconomics* 1994;5:5-62

Bataillard A, Freiche JC, Vincent M, Touraine JL, Sassard J. Effects of neonatal thymectomy on blood pressure and immunological characteristics of genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *J Hypertens* 1986;4:5445-5447

Bataillard A, Renaudin C, Sassard J. Silica attenuates hypertension in Lyon hypertensive rats. *J Hypertens* 1995;13:1581-1584

Bataillard A, Vincent M, Sassard J, Touraine JL. Antihypertensive effect of an immunosuppressive agent, cyclophosphamide, in genetically hypertensive rats of Lyon strain. *Int J Immunopharmacol* 1989;124:132-138

Bendlich A, Belisle EH, Strausser HR. Immune system modulation and its effector on the blood pressure of the spontaneously hypertensive rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1981;99:600-607

Beutler B, Cerami A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. *Adv Immunol* 1988;42:213-232.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau G, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA. Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4533-4537

Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Interleukin-1 acts on cultured vascular endothelial cells to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985;76:2003-2011

Bevilacqua MP, Stenglin S, Gimbrone MA, Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule-1. An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-1165

Bienvenu J, Coulon L, Doche C, Gutowski M-C, Grau GE. Analytical performance of commercial ELISA-kits for IL-2, IL-6 and TNF- α : a WHO study. *Eur Cytokine Netw* 1993;4:447-451

Blann AD, Tse W, Maxwell SJR, Waite MA. Increased levels of soluble adhesion molecule E-selectin in essential hypertension. *J Hypertens* 1994;12:925-928

Blann AD, Waite MI. Von Willebrand Factor and soluble E-selectin in hypertension: influence of treatment and value in prediction of progression of atherosclerosis. *Coron Artery Dis* 1996;7:143-147

Blann AD. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. Br J Biomed Sci 1993;50:125-134

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. Nature 1998;394:894-897

Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 1968;23:31-42

Brach MA, Herrmann F. Interleukin 6 : presence and future. Int Clin Lab Res 1992;22:143-151

Bruce I, McNally J, Bell A. Enhanced monocyte generation of reactive oxygen species in primary systemic vasculitis. J Rheumatol 1997;24:2364-2370

Cagan AR. Atherosclerosis of the aorta and coronary arteries in five towns. Bull WHO 1976;53:485-645

Capers Q, Alexander R, Lou P, DeLeon H, Wilcox JN, Ishizaka N, Howard AB, Taylor WR. Monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic tissues of hypertensive rats. Hypertension 1997;30:1397-1402

Carlos TM, Harlan JM. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. Immunol Rev 1990;114:5-28

Carman WJ, Barrett-Connor E, Sowers M, Khaw KT. Higher risk of cardiovascular mortality among lean hypertensive individuals in Tecumseh, Michigan. *Circulation* 1994;89:703-711

Chen C-M, Schachter D. Elevation of plasma immunoglobulin A in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1993;21:731-738

Chobanian AV. Adaptive and maladaptive responses of the arterial wall to hypertension. 1989 Corcoran Lecture. *Hypertension* 1990;15:666-674

Chobanian AV, Alexander RW. Exacerbation of atherosclerosis by hypertension. *Arch Intern Med* 1996a;156:1952-1956

Chobanian AV, Dzau VJ. Renin-angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Lippincott-Raven Verlag, Philadelphia (1996b:237-242)

Chromczynski P, Sacchi N. Single Stepp method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159

Cigola E, Kajstura J, Li B, Meggs LG, Anversa P. Angiotensin II activates programmed myocyte cell death in vitro. *Exp Cell Res* 1997;231:363-371

Clozel M, Kuhn H, Hefti F, Baumgartner HR. Endothelial dysfunction and subendothelial monocyte macrophages in hypertension. *Hypertension* 1991;18:132-134

Cominelli F, Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis of and protection from inflammatory bowel disease. *Biotherapy* 1989;1:369-375

Cominelli F, Pizarro TT. Interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10:49-53

Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr.. Endothelial expression of mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991;251:788-791

Daemen MJ, Lo DM, Bosman FT, Schwartz SM. Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-456

Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos KC. Increased serum levels of interleukin-1 β in the systemic circulation of patients with essential hypertension: Additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med* 1997;129:300-308

Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 1993;171:223-229

De Gasparo M, Siragy HM. The AT₂ receptor: fact, fancy and fantasy. *Regul Pept* 1999;81:11-24

DeSouza CA, Dengel DR, Macko RF, Cox K, Seals DR. Elevated levels of circulating cell adhesion molecules in uncomplicated essential hypertension. *Am J Hypertens* 1997;10:1335-1341

Devaraj S, Jialal I. Low-density lipoprotein postsecretory modification, monocyte function, and circulating adhesion molecules in type 2 diabetic patients with and without macrovascular complications: the effect of alpha-tocopherol supplementation. *Circulation* 2000;102:191-196

Dinarello CA. Biological basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147

Dinarello CA. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997;8:253-265

Dinarello CA. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor in systemic responses to infection and inflammation. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. *Inflammation. Basic principles and clinical correlates*. Raven Verlag, New York (1992:211-233)

Dinarello CA, Wolff SM. The role of interleukin 1 in disease. *N Engl J Med* 1993;328:106-113

Dörffel Y, Franz S, Pruß A, Neumann G, Rohde W, Burmester GR, Scholze J. Preactivated monocytes from hypertensive patients as a factor for atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001;157:151-160

Dörffel Y, Lätsch C, Stuhlmüller B, Schreiber S, Scholze S, Burmester GR, Scholze J. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension. *Hypertension* 1999;34:113-117

Dörffel-Rückert Y, Schindler U, Heinig T, Nikolaus S, Raedler A, Schreiber S. IL-4 signaling mechanisms in inflammatory bowel disease mononuclear phagocytes. *Inflamm Bowel Dis* 1996;2:244-252

Ebringer A, Rosenbaum M, Pincus N, Doyle A. Changes in serum immunoglobulins after myocardial infarction. *Am J Med* 1971;50:297-301

Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 1984;4:323-340

Fanon LD, Braylan RC, Phillips MI. Alterations of lymphocyte populations during development of the spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1992;10:629-634

Farber HW, Center DM, Rounds S. Bovine and human endothelial cell production of neutrophil chemoattractant activity in response to components of the angiotensin system. *Circ Res* 1985;57:898-902

Ferri C, Desideri G, Valenti M, Bellini C, Pasin M, Santucci A, De-Mattia G. *Hypertension* 1999;34:568-573

Ferrieres J, Elias A, Ruidavets JB, Cantet C, Bongard V, Fauvel J, Boccalon H. Carotid intima-media thickness and coronary heart disease risk factors in a low-risk population. *J Hypertens* 1999;17:743-748

Ferro D, Parrotto S, Basili S, Alessandri C, Violi F. Simvastatin inhibits the monocyte expression of proinflammatory cytokines in patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:427-431

Fiotti N, Giansante C, Ponte E, Delbello C, Calabrese S, Zacchi T, Dobrina A, Guarnirei G. Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease. *Atherosclerosis* 1999;145:51-60

Foris G, Dezso B, Medgyesi G, Fust G. Effect of angiotensin II on macrophage functions. *Immunology* 1983;48:277-283

Frost D, Friedl A, Beischer W. Bestimmung der Intima-Media-Dicke an der Arteria carotis: methoden-, probanden- und untersucherabhängige Einflüsse. *Ultraschall Med* 1998;19:168-173

Frostegard J, Wu R, Gillis-Haegerstrand C, Lemne C, de Faire U. Antibodies to endothelial cells in borderline hypertension. *Circulation* 1998;98:1092-1098.

Fry DL. Hemodynamic forces in atherogenesis. In: Scheinberg P. Cerebrovascular diseases. Raven Verlag, New York (1976:77-95)

Fuhlbrigge RC, Chaplin DD, Kiely J-M, Unanue ER. Regulation of interleukin 1 gene expression by adherence and lipopolysaccharide. *J Immunol* 1987;138:3799-3802

Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griendling KK, Harrison DG. Modulation of extracellular superoxide dismutase expression by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 1999;85:23-28

Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Inflammation. Basic principles and clinical correlates. Raven Verlag, New York (1992)

Gamble G, Beaumont B, Smith H, Zorn J, Sanders G, Merrileers M, MacMahon S, Sherpe N. B-mode ultrasound images of the carotid artery wall: correlation of ultrasound with histological measurements. *Atherosclerosis* 1993;102:163-173

Gasic S, Ratheiser K, Wagner O, Nowotny P, Vierhappner H, Waldhausl W. Alterations in angiotensin II release and vascular reactivity in hypertensive men: a pilot study. *Am J Hypertens* 1999;12:1055-1062

Gerrity RG. The role of the monocyte in atherogenesis. I. Transition of blood-borne monocytes into foam cells in fatty lesions. *Am J Pathol* 1981;103:181-200

Gerrity RG, Naito HK, Richardson M, Schwartz CJ. Dietary induced atherogenesis in swine: morphology of the intima in prelesion stages. *Am J Pathol* 1979;95:775-792

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA, Jr, Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A. MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 1999;398:718-723

Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ. Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia: autocrine transforming growth factor- β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992;90:456-461

Gimbrone MA, Jr, Bevilacqua MP, Cybulsky MI. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte adhesion inflammation and atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1990;598:77-85

Ginis I, Mentzer SJ, Faller DV. Oxygen tension regulates neutrophil adhesion to human endothelial cells via an LFA-1-dependent mechanism. *J Cell Physiol* 1993;157:569-578

Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, Gonzalez D, Coca A, De La Sierra A. Renin-angiotensin system genetic polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 2000;35:512-517

Gmeling-Meyling F, Waldmann TA. Separation of human blood monocytes and lymphocytes on a continuous percoll gradient. *J Immunol Methods* 1980;33:1-9

Goonasekera CD, Shah V, Rees DD, Dillon MJ. Vascular endothelial cell activation associated with increased plasma asymmetric dimethyl arginine in children and young adults with hypertension: a basis for atheroma? *Blood Press* 2000;9:16-21

Griendling KK, Alexander RW. Cellular biology of blood vessels. In: Schlant RC, Alexander RW. Hurst's The Heart. McGraw-Hill Verlag, New York (1994:31-45)

Grunfeld S, Hamilton CA, Mesaros S, McClain SW, Dominiczak AF, Bohr DF, Malinski T. Role of superoxide in the depressed nitric oxide production by the endothelium of genetically hypertensive rats. Hypertension 1995;26:854-857

Gudbrandsson T, Herlitz H, Lindholm L, Nilsson LA, Hansson L. Immunological changes in patients with previous malignant essential hypertension. Lancet 1981;i:406-408

Hahn AWA, Jonas F, Bühler FR, Resink TJ. Activation of human peripheral monocytes by angiotensin II. FEBS Lett 1994;347:178-180

Hajjar KA, Hajjar DP, Silverstein RL, Nachman RL. Tumor necrosis factor-mediated release of platelet-derived growth factor from cultured endothelial cells. J Exp Med 1987;166:235-245

Haudenschild CC, Prescott MF, Chobanian AV. Aortic endothelial and subendothelial cells in experimental hypertension and aging. Hypertension 1981;3:148-153

Hayek T, Aviram M, Heinrich R, Sakhnini E, Keidar S. Losartan inhibits cellular uptake of oxidized LDL by monocyte-macrophages from hypercholesterolemic patients. Biochem Biophys Res Commun 2000; 273:417-420

Hernandez-Presa M, Bustos C, Ortego M, Tunon J, Renedo, Ruiz-Ortega M, Egido J. Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor kappa-B

activation, monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:1532-1541

Heyl W, Heintz B, Reister F, Witte K, Lemmer B, Rath W. IL-1 β und TNF- α Ausscheidung im Urin von normo- und hypertensiven Schwangeren. Deutsche Hypertonie Gesellschaft 20.Tagung 1996: A156

Hicks C, Breit SN, Penny R. Response of microvascular endothelial cells to biological response modifiers. *Immunol Cell Biol* 1989;67:271-277

Hill CM, Lunec J. The TNF-ligand and receptor superfamilies: controllers of immunity and the Trojan horses of autoimmune disease? *Mol Aspects Med* 1996;17:455-509

Hilme E, Hansson L, Sandberg L, Söderström T, Herlitz H. Abnormal immune function in malignant hypertension. *J Hypertens* 1993;11:989-994

Hilme E, Herlitz H, Söderström T, Hansson L. Increased secretion of immunoglobulins in malignant hypertension. *J Hypertens* 1989;7:91-95

Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol Today* 1990;11:443-449

Holtz J, Goetz M. Vascular renin-angiotensin system, endothelial function and atherosclerosis? *Basic Res Cardiol* 1994;89:171-186

Homma S, Ishii T, Tsugane S, Hirose N. Different effects of hypertension and hypercholesterolemia on the natural history of aortic atherosclerosis by the stage of intimal lesions. *Atherosclerosis* 1997;128:85-95

Iwai N, Inagami T, Ohmichi N, Kinoshita M. Renin is expressed in rat macrophage/monocyte cells. *Hypertension* 1996;27:399-403

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minck CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973;52:2745-2756

Janabi M, Yamashita S, Hirano K, Sakai N, Hiraoka H, Matsumoto K, Zhang Z, Nozaki S, Matsuzawa Y. Oxidized LDL-induced NF-kappa B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1953-1960

Jelinek DF, Lipsky PE. Enhancement of human B cell proliferation and differentiation by tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J Immunol* 1987;139:2970-2976

JNC-VI: The sixth report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure. *Arch Intern Med* 1997;157:2413-2446

Johnston RB. Current concepts: Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988;318:747-752

Kalra VK, Ying Y, Deemer K, Natarajan R, Nadler JL, Coates TD. Mechanism of cigarette smoke condensate induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *JCell Physiol* 1994;160:154-162

Kannel WB. Coronary atherosclerotic sequelae of hypertension. In: Oparil S, Weber MA. Hypertension: A companion to Brenner and Rector's „ The kidney“. WB Saunders Company, Philadelphia (2000:235-244)

Kannel WB. Epidemiology of coronary atherosclerosis: post mortem vs clinical risk factors correlations. The Framingham Study. In: Gotto AM Jr, Smith LC, Allen B. Atherosclerosis. Springer Verlag, New York (1980:54-56)

Kannel WB. Hypertension as a risk factor for cardiac events-epidemiologic results of long-term studies. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;21:S27-37

Kannel WB, Neaton JD, Wentworth D, Thomas HE, Stamler J, Hulley SB, Kjelsberg MO. Overall and coronary heart disease mortality rates in relation to major risk factors in 325, 348 men screened for MRFIT: Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Am Heart J* 1986;112:825-836

Keidar S. Angiotensin, LDL peroxidation and atherosclerosis. *Life Sci* 1998;63:1-11

Khraibi AA, Smith TL, Hutchins PM, Lynch CD, Dusseau JW. Thymectomy delays the development of hypertension in Okamoto spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1987;5:537-541

Kim JA, Territo MC, Wayner E, Carlos TM, Parhami F, Smith CW, Haberland ME, Fogelman AM, Berliner JA. Partial characterization of leucocyte binding molecules on endothelial cells induced by minimally oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 1994;24:427-433

Kirkham B. Interleukin 1, immune activation pathways, and different mechanisms in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:395-400

Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T. Localization of T lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Arch Pathol Anat* 1993;423:433-442

Kitahora T, Suzuki K, Asakura H, Yoshida T, Suematsu M, Watanabe M, Aiso S, Tsuchiya M. Active oxygen species generated by monocytes and polymorphonuclear cells in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1988;33:951-955

Kitazono T, Padgett RC, Armstrong ML, Tompkins PK, Heistad DD. Evidence that angiotensin II is present in human monocytes. *Circulation* 1995;91:1129-1134

Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999;43:562-571

Komatsu S, Panés J, Russell JM, Anderson DC, Muzykantov VR, Miyasaka M, Granger ND. Effects of chronic arterial hypertension on constitutive and induced intercellular adhesion molecule-1 expression in vivo. *Hypertension* 1997;29:683-689

Kontos HA, George E. Brown memorial lecture. Oxygen radicals in cerebral vascular injury. *Circ Res* 1985;57:508-516

Kranzhofer R, Browatzki M, Schmidt J, Kubler W. Angiotensin II activates transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:826-828

Kristensen BO. Increased serum levels of immunoglobulins in untreated and treated essential hypertension. *Acta Med Scand* 1978a;203:49-54

Kristensen BO, Andersen PL. Autoantibodies in untreated and treated essential hypertension. *Acta Med Scand* 1978b;203:55-59

Kurokawa K, Okuda T. Genetic and non-genetic basis of essential hypertension: maladaptation of human civilization to high salt intake. *Hypertens Res* 1998;21:67-71

Kyriakis JM. Activation of the AP-1 transcription factor by inflammatory cytokines of the TNF family. *Gene Expr* 1999;7:217-231

Landmann R, Scherer F, Schumann R, Link S, Sansano S, Zimmerli W. LPS directly induces oxygen radical production in human monocytes via LPS binding protein and CD14. *J Leukoc Biol* 1995;57:440-449

Langstein J, Becke FM, Sollner L, Krause G, Brockhoff G, Kreutz M, Andreessen R, Schwarz, H. Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:117-122

Laursen JB, Rajagopalan S, Galis Z, Tarpey M, Freeman BA, Harrison DG. Role of superoxide in angiotensin II-induced but not catecholamine-induced hypertension. *Circulation* 1997;95:588-593

Liao Z, Tu JH, Small CB, Schnipper SM, Rosenstreich DL. Increased urine interleukin-1 levels in aging. *Gerontology* 1993;39:19-27

Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol* 1990;10:2327-2334

Liu Y, Liu T, McCarron RM, Spatz M, Feuerstein G, Hallenbeck JM, Sirén A-L. Evidence for activation of endothelium and monocytes in hypertensive rats. *Am J Physiol* 1996;270:H2125-H2131

Luft FC. Salt and hypertension at the close of the millennium. *Wien Klin Wochenschrift* 1998;110:459-466

Luhm J, Kirchner H, Rink L. One way synergistic effect of low superantigen concentrations on lipopolysaccharide induced cytokine production. *J Interferon Cytokine Res* 1997;17:229-238

Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995;118:81-90

Lusiani L, Visona A, Pagnan A. Arterial hypertension and atherosclerosis of carotid arteries: a non-invasive study. *Stroke* 1990; 21:410-414

Marodi L, Korchak HM, Johnston RB. Mechanisms of host defense against candida species. I Phagocytosis by monocytes and monocyte derived macrophages. *J Immunol* 1991;146:2783-2789

Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB. Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon- γ : Increased phagocytosis killing and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* 1993;91:2596-2601

Marui N, Offerman M, Swerlick R, Kunsch C, Rosen CA, Ahmad M, Alexander RW, Medford RM. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1866-1874

McCarron RM, Wang L, Siren AL, Spatz M, Hallenbeck JM. Monocyte adhesion to cerebrovascular endothelial cells derived from hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* 1994;267:H2491-H2497

McGill HC, Arias-Stella J, Carbonell LM. General findings of the international atherosclerosis project. *Lab Invest* 1968;18:498-502

Medford RM. Vascular cell-adhesion molecule-1 (VCAM-1) gene transcription and expression are regulated through an antioxidant sensitive mechanism in human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1993;92:1866-1874

Medvedev AE, Kopydlowski KM, Vogel SN. Inhibition of lipopolysaccharide-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine, chemokine, and toll-like receptor 2 and 4 gene expression. *J Immunol* 2000;164:5564-5574

Milhoan KA, Lane LA, Bloor CM. Hypoxia induces endothelial cells to increase their adherence for neutrophils: role of PAF. *Am J Physiol* 1992;263:H956-H962

Molenaar R, Visser WJ, Verkerk A, Koster JF, Jongkind JF. Peroxidative stress and in vitro ageing of endothelial cells increases the monocyte-endothelial cell adherence in a human in vitro system. *Atherosclerosis* 1989;76:193-202

Montoya MC, Luscinskas FW, del Pozo MA, Aragonés J, de Landazuri MO. Reduced intracellular oxidative metabolism promotes firm adhesion of human polymorphonuclear leukocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Eur J Immunol* 1997;27:1942-1951

Mooradian AD, Reed RL, Osterweil D, Clements N, Scuderi P. Lack of an association between the presence of tumor necrosis factor or interleukin-1 alpha in the blood and weight loss among elderly patients. *J Am Geriatr Soc* 1990;38 :397-401

Mörl H, Menges H-W. Gefäßkrankheiten in der Praxis. Thieme-Verlag, Stuttgart (2000)

Mysliwska J, Bryl E, Foerster J, Mysliwski A. The upregulation of TNF alpha production is not a generalised phenomenon in the elderly between their sixth and seventh decades of life. Mech Ageing Dev 1999;107:1-14

Moser M. Clinical management of hypertension. Professional Communications Verlag, Caddo, USA (1999)

Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF, Jr; Gimbrone MA, Jr. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. J Clin Invest 1994;94:885-891

Neta R, Sayers TJ, Oppenheim JJ. Relationship of TNF to interleukins. Immunol Ser 1992;56:499-566

Olsen F. Delayed hypersensitivity and essential hypertension: Delayed hypersensitivity against arterial wall components as a pathogenetic factor in essential hypertension. Acta Pathol Microbiol Scand 1974;82:448-450

Olsen F. Induction of chronic arterial hypertension in rats by repeated transient hypertensive rises in blood pressure. Acta Pathol Microbiol Scand 1981;89:105-109

Olsen F, Laybourn C, Drivsholm L. Evidence of the development of delayed-type autoimmunity against arterial vessel wall antigens following acute hypertensive damage to arterial vessels in rats. Acta Med Scand 1984;693:133-137

Palù CD. Hypertension and atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 1996;10:S89-S92

Paul M, Bachmann J, Ganten D. The tissue renin-angiotensin system in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 1992;2:94-99

Pit'ha J, Krajickova D, Cifkova R, Hubacek J, Petrzilkova Z, Hejl Z, Stavek P, Skibova J, Poledne R. Intima-media thickness of carotid arteries in borderline hypertensives. *J Neuroimaging* 1999;9:19-22

Potter DD, Sobey CG, Tompkins PK, Rossen JD, Heistad DD. Evidence that macrophages in atherosclerotic lesions contain angiotensin II. *Circulation* 1998;98:800-807

Pueyo ME, Arnal JF, Rami J, Michel J-B. Angiotensin II stimulates the production of NO and peroxynitrite in endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274:C214-220

Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Vuster V, Ross R, and Topol EJ. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (1996:539-555)

Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griendling KK, Harrison DG. Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 1996;97:1916-1923

Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Mosby-Verlag, London (1998)

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebnder S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196:137-151

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-126

Ross R. Platelet-derived growth factor. *Annu Rev Med* 1987;38:71-79

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;50:125-134

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1986;314:488-490

Rossi GP, Rossi A, Zanin L, Calabro A, Feltrin GP, Pessina AC, Crepaldi G, Dal-Palu C. Excess prevalence of carotid artery lesions in renovascular hypertension. *Am J Hypertens* 1992;5:8-15

Rudd AG, Banerjee DK. Interleukin-1 production by human monocytes in ageing and disease. *Age Ageing* 1989;18:43-46

Sagar S, Kallo IJ, Kaul N, Ganguly NK, Sharma BK. Oxygen free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem* 1992;111:103-108

Saito Y, Berk BC. Transactivation: a novel signaling pathway from angiotensin II to tyrosine kinase receptors. *J Moll Cell Cardiol* 2001;33:3-7

Sarzani R, Brecher P, Chobanian AV. Growth factor expression in aorta of normotensive and hypertensive rats. *J Clin Invest* 1989;83:1404-1408

Scannell G, Waxman K, Vaziri ND, Zhang J, Kaupke CJ, Jalali M, Hecht CC. Hypoxia-induced alterations of neutrophil membrane receptors. *J Surg Res* 1995;59:141-145

Schaffner T, Taylor K, Bantucci EJ, Fischer-Dzoga K, Beeson JH, Glagov S, Wissler RW. Arterial foam cells with distinctive immunomorphologic and histochemical features of macrophages. *Am J Pathol* 1980;100:57-70

Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000;101:1372-1378

Schmid-Schönbein GW, Seiffge D, DeLano FA, Shen K, Zweifach BW. Leucocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Hypertension* 1991;17:323-330

Scholze J. Hypertonie-Risikokonstellationen und Begleiterkrankungen. Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin, Wien (1999)

Schreiber S, Koop I, Bauditz J, Nikolaus S, Ortner M, Lochs H, Raedler A. Predictors of relaps in IBD: Increased secretion of pro-inflammatory cytokines by LPMNC. *Gut* 1995;37:113

Schreiber S, Raedler A, Stenson WF, MacDermott RP. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1992;21:451-502

Shang XZ, Issekutz AC. Enhancement of monocyte transendothelial migration by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: requirement for chemoattractant and CD11a/CD18 mechanisms. *Eur J Immunol* 1999;29:3571-3582

SHEP Cooperative Research Group. Prevention of stroke by anti-hypertensive drug treatment in older persons with isolated systolic hypertension: final results of the Systolic Hypertension in the Elderly Programm (SHEP). *JAMA* 1991;265:3255-3264

Simms H, Damico R. Regulation of polymorphonuclear neutrophil CD16 and CD11b/CD18 expression by matrix proteins during hypoxia is VLA-5, VLA-6 dependent. *J Immunol* 1995;155:4979-4990

Simon A, Levenson J. Stratification of vascular risk in hypertension and therapeutic perspective. *Am J Hypertens* 1995;8:45-48

Simons PC, Algra A, Bots ML, Grobbee DE, van der Graaf Y. Common carotid intima-media thickness and arterial stiffness: indicators of cardiovascular risk in high-risk patients. The SMART Study (Second Manifestations of ARTerial disease). *Circulation* 1999;100:951-957

Singhal PC, Sagar P, Gupta S, Arya M, Gupta M, Prasad A, Loona R, Sharma P, Mattana J. Pressure modulates monocyte migration. *Am J Hypertens* 1997;10:1297-1301

Spiering W, Kroon AA, Fuss-Lejeune MM, Daemen MJ, de Leeuw PW. Angiotensin II sensitivity is associated with the angiotensin II type 1 receptor A(1166)C polymorphism in essential hypertensives on a high sodium diet. *Hypertension* 2000;36:411-416

Stamler J, Neaton JD, Wentworth DN. Blood pressure and risk of fatal coronary heart disease. *Hypertension* 1989;13:2-12

Stent G, Crowe SM. Effects of monocyte purification and culture on integrin expression. *APMIS* 1997;105:663-670

Strawn WB, Gallagher PE, Tallant EA, Ganten D, Ferrario M. Angiotensin II AT1-receptor blockade inhibits monocyte activation and adherence in transgenic (mRen2)²⁷ rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:341-351

Susic D. Hypertension, aging, and atherosclerosis. The endothelial interface. *Med Clin North Am* 1997;81:1231-1240

Swanek JL, Tsen MF, Cobb MH, Thomas JA. IL-1 receptor associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. *J Immunol* 2000;164:4301-4306

Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schönbein GW. Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension* 1997;30:1628-1633

Swerlick RA, Lee KH, Li L-J, Sepp NT, Caugham SW, Lawley TJ. Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J Immunol* 1992;149:698-705

Takeichi N, Ba D, Kobayashi H. Natural cytotoxic autoantibody against thymocytes in spontaneously hypertensive rats. *Cell Immunol* 1981;60:181-190

Takeichi N, Suzuki K, Okayasu H, Kobayashi H. Immunological depression in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Immunol* 1980;40:120-126

Takemori K, Ito H, Suzuki T. Effects of the AT1 receptor antagonist on adhesion molecule expression in leukocytes and brain microvessels of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens* 2000;113:1233-1241

Tracey KJ, Cerami A. Metabolic responses to catechin/TNF. A brief review. *Ann N Y Acad Sci* 1990;587:325-331

Tsao PS, Niebauer J, Buitrago R, Lin PS, Wang B, Cooke JP, Chen YI, Reaven GM. Interaction of diabetes and hypertension on determinantes of endothelial adhesiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:947-953

Tummala PE, Chen X-L, Sundell CL, Laursen JB, Hammes CP, Alexander RW, Harrison DG, Medford RM. Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature. *Circulation* 1999;100:1223-1229

Vachier I, Damon M, Le Doucen C, Crastes de Paulet A, Chanez P, Michel FB, Godard P. Increased oxygen species generation in blood monocytes of asthmatic patients. *Am Rev Respir Dis* 1992;146:1161-1166

Vaddi K, Nicolini FA, Mehta P, Mehta JL. Increased secretion of tumor necrosis factor- α and interferon- γ by mononuclear leukocytes in patients with ischemic heart disease. Relevance in superoxide anion generation. *Circulation* 1994;90:694-699

Vanhoutte PM, Boulanger CM. Endothelium-dependent responses in hypertension. *Hypertens Res* 1995;18:87-98

Violi F, Criqui M, Longoni A, Castiglioni C, ADEP Group. Relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease. Results from the ADEP study. *Atherosclerosis* 1996;120:25-35.

Volk T, Gerst J, Faust-Belbe G, Stroehmann A, Kox WJ. Monocyte stimulation by reactive oxygen species: role of superoxide and intracellular Ca^{2+} . *Inflamm Res* 1999;48:544-549

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9717-9721

Watanabe T, Fan J. Atherosclerosis and inflammation mononuclear cell recruitment and adhesion molecules with reference to the implication of ICAM-1/LFA-1 pathways in atherogenesis. *Int J Cardiol* 1998;66:45-53

Wei EP, Kontos HA, Christman CW, DeWitt DS, Povlishock JT. Superoxide generation and reversal of acetylcholine-induced cerebral arteriolar dilatation after acute hypertension. *Circ Res* 1985;57:781-787

Wick G, Schett G, Amberger A, Kleindienst R, Xu Q. Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today* 1995;16:27-33

Wolvekamp MC, Marquet RL. Interleukin-6: historical background, genetics and biological significance. *Immunol Lett* 1990;24:1-9

Working group on management of patients with hypertension and high blood cholesterol. National educational program working group report on the management of patients with hypertension and high blood cholesterol. *Ann Intern Med* 1991;114:224-237

Zambetis-Bellesis M, Dusting GJ, Mendelsohn FA, Richardson K. Autoradiographic localization of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II binding sites in early atheroma-like lesions in rabbit arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1991;18:337-340

Zembala M, Asherson GL. Human monocytes. Academic Verlag, Boston (1989)

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. J. Scholze bin ich für die vorbehaltlose und immerwährende Unterstützung, die fruchtbare Diskussion sowie die großzügigen Möglichkeiten zur Durchführung der Untersuchungen sehr verbunden.

Herrn Prof. Dr. G. R. Burmester danke ich für den kreativen inhaltlichen Diskurs und die großzügige Unterstützung zur Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. W. Rohde danke ich für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Herrn Prof. Dr. S. Schreiber danke ich für die Möglichkeiten, die Grundlagen des hier vorgestellten experimentellen Ansatzes entwickeln zu können.

Mein nachdrücklicher Dank gilt meinem Mann, Wolf V. Dörffel, für den intensiven wie kreativen inhaltlichen Diskurs, die unendliche Geduld und immerwährende familiäre Unterstützung.

Ausdrücklich danke ich allen Kollegen, Mitarbeitern und Doktoranden, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren:

Frau Nowigk, Frau Kohl, Frau Zillmann, Axel Pruß, Bruno Stuhlmüller, Ute Ungethüm, Uta Syrbe, Susa Nikolaus, Christoph Lätsch, Stephanie Franz, Viola Bresan, Gesa Neumann, Nicolai Bochnig, Susan Lau.

Die Arbeit ist Herrn Prof. Dr. H. Berndt in tiefer Verehrung gewidmet.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Gemäß der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, an Eides statt:

- daß keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind
- daß weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- daß die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden
- daß die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind
- daß mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist

Berlin, den 12.06.2001

Dr. Yvonne Dörffel